

ANNALES  
DE  
**L'INSTITUT PASTEUR**

**Transformation reversible du trioxyméthylène  
EN MÉTHANAL**

Application à l'étude de la stérilisation par le méthanal sec  
aux températures élevées.

PAR L. PERDRIX

On connaît depuis longtemps les propriétés antiseptiques du méthanal (aldéhyde formique) : de nombreux travaux ont été effectués sur ce sujet, et, depuis plusieurs années, la stérilisation des appartements et des objets par le méthanal sec ou le formol est entrée dans le domaine pratique,

Dans cet ordre d'idées cependant, l'application a devancé l'étude vraiment rationnelle de la question. Le principe de tous les procédés de désinfection consiste, en effet, à introduire, dans un espace clos et pendant un certain temps, un volume déterminé d'aldéhyde formique, obtenu d'une façon quelconque ; on admet implicitement que l'action est proportionnelle à la masse gazeuse entrant en expérience. Or, toutes les personnes qui ont employé ce désinfectant ont constaté sa facile et rapide transformation en une poudre blanche, le trioxyméthylène, qui se dépose de place en place sur les objets solides : c'est un phénomène de polymérisation qui se manifeste chez tous les composés présentant la fonction aldéhydique. Il est facile de montrer cette polymérisation par l'expérience suivante. Si l'on chauffe du trioxyméthylène dans une cornue, il se dégage de l'aldéhyde formique ; lorsque le gaz a chassé complètement l'air de l'appareil, recueillons et

laissons ensuite séjourner sur la cuve à mercure quelques éprouvettes de méthanal. Immédiatement, il se produit une diminution de volume; puis, après le refroidissement du gaz, la contraction devient de plus en plus manifeste; et, au bout de quelques instants, les éprouvettes se tapissent de petits cristaux blancs et se remplissent à peu près entièrement de mercure, montrant ainsi que la transformation du méthanal en trioxyméthylène est presque complète à la température ordinaire.

Dans ces deux phénomènes inverses, le facteur qui détermine l'action dans un sens ou dans l'autre est certainement la température, comme je vais le montrer plus loin.

Ceci posé, comment apprécier la proportion de méthanal existant réellement dans une enceinte? Quelles conséquences en découlent au point de vue de la stérilisation?

Telles sont les questions que j'ai résolues en déterminant d'abord la marche de la transformation physico-chimique réversible du trioxyméthylène en méthanal, et en faisant ensuite l'application de la loi expérimentale trouvée à l'étude de la stérilisation par le gaz antiseptique à différentes températures.

## I

## ÉTUDE DE L'ÉQUILIBRE DU SYSTÈME : TRIOXYMÉTHYLÈNE ET MÉTHANAL

Deux tubes de Torricelli sont placés côte à côte dans une même cuvette à mercure; l'un d'eux, A, sert de baromètre; dans l'autre, B, on introduit quelques petits morceaux de trioxyméthylène sec. L'appareil tout entier est placé dans une armoire étuve vitrée, que l'on maintient, au moyen d'un régulateur à mercure, à des températures bien constantes et de plus en plus élevées. Les expériences ont été effectuées de cette façon entre 13° et 98°. — Pour les températures inférieures, le tube B était entouré, à sa partie la plus élevée, d'un manchon renfermant de l'éther, que l'on refroidissait par une évaporation plus ou moins rapide.

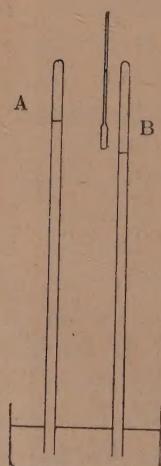


Fig. 1.

La température était déterminée par un thermomètre, accolé au tube B, divisé en degrés et

1/2 degrés. La différence des niveaux A et B était appréciée au moyen d'un cathétomètre ; elle mesurait la tension du méthanal à la température correspondante. Cette tension fixe n'était complètement atteinte qu'au bout de 2 à 3 heures. Je me suis astreint à ne faire les mesures que lorsque la température lue au thermomètre était restée constante au moins pendant 4 heures. Pour chaque lecture, le nombre trouvé expérimentalement était multiplié par le facteur  $\frac{1}{1 + \frac{t}{5.550}}$ , afin d'exprimer la tension en colonne de mercure à 0°.

Voici les résultats fournis par l'expérience (Colonne M) :

Températures.	M Tensions de transformation du méthanal.	E Tensions maxima de la vapeur d'eau.	Températures.	M Tensions de transformation du méthanal.	E Tensions maxima de la vapeur d'eau.
- 4°	7 m/m	3,4 m/m	42°	60 m/m	61 m/m
0	8 —	4,6 —	45	67 —	71 —
+ 3	9 —	5,6 —	48	77 —	83 —
6	11 —	7 —	59	130 —	142 —
13	17 —	11 —	70	210 —	233 —
18	21 —	15 —	81	326 —	369 —
28	32 —	28 —	86	393 —	450 —
36	44 —	44 —	98	559 —	707 —
38	48 —	49 —	100	583 — (par extrapolation)	760 —

Ces nombres peuvent être rapprochés de ceux qui correspondent aux tensions maxima de la vapeur d'eau ; pour rendre la comparaison plus facile, j'ai inscrit ces derniers dans la colonne E.

En somme, à une température donnée, le trioxyméthylène se transforme en méthanal jusqu'au moment où le gaz atteint une tension maxima limite. — Pour voir s'il s'agit bien d'un équilibre, il convient d'effectuer l'expérience inverse, comme on le fait généralement dans l'étude des transformations allotropiques.

L'étuve étant, par exemple, à 98°, j'abaisse brusquement sa

température à  $48^\circ$  : aussitôt, le mercure remonte dans le tube manométrique, et je suis simultanément la marche descendante de la température et la diminution de la tension de l'aldéhyde qui se transforme en trioxyméthylène. Cette tension redescend à 77 millimètres, chiffre correspondant du tableau ci-dessus, et s'y maintient à nouveau. — Dans cette deuxième phase du phénomène, l'équilibre est même atteint plus rapidement par le tube manométrique que par le thermomètre. — La pression de

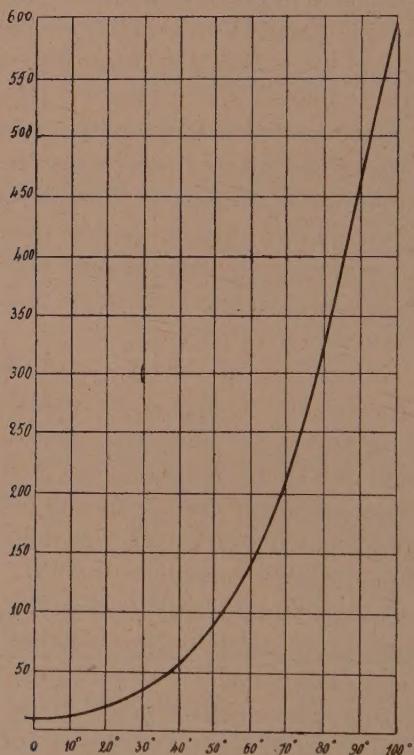


Fig. 2. — Courbe des tensions de transformation du trioxyméthylène en méthanal.  
(Abscisses : température; ordonnées : tensions.)

77 millimètres limite à  $48^\circ$  les deux transformations inverses et est caractéristique de la température. Il en est de même pour tous les degrés de l'échelle thermométrique. Le phénomène se présente donc comme une transformation allotropique, un état d'équilibre variable avec la température seule, semblable à celui qui se manifeste avec le paracyanogène et le cyanogène, avec la vapeur

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MEDECINE  
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN. 120 — PARIS — VI<sup>e</sup> ARR.

## RÉCENTES PUBLICATIONS MÉDICALES

Précis de Diagnostic médical

par P. Spillmann,  
professeur de cli-

Précis de Médecine infantile

**Clinique** à l'Exploration  
**CY. P. Haushalter**, professeur de clinique infantile à l'Université de Nancy, et **L. Spillmann**, professeur agrégé à l'Université de Nancy. 1 vol. in-8° de la Collection de Précis Médico-chirurgicaux, parus en 1953, avec une notice médicale à l'Université de Nancy.

7 fr.

Ce livre s'adresse aux étudiants et aux médecins pratiquants.

Ce petit volume est un livre nouveau : il aspire à être le guide de l'étudiant à l'hôpital et même à servir au praticien dans son cabinet. — Cet ouvrage est divisé en trois parties : Dans une première partie, les auteurs passent en revue les différents modes d'investigation que la science met à notre disposition pour découvrir les symptômes de la maladie. Ils indiquent l'usage que nous devons faire de nos divers sens et des instruments qui suppléent à leur insuffisance. — Dans la deuxième partie, les auteurs exposent la meilleure méthode pour examiner les malades et explorer les organes. — Dans la troisième, ils discutent les signes qui, par leur réunion ou leur valeur pathognomonique, distinguent chaque maladie et la différencient des malades du même groupe. Les auteurs se sont effor-

Ce livre nous offre une étude approfondie et complète de l'anatomie pathologique de l'oreille humaine. L'auteur, M. J. C. G. H. van der Horst, a réussi à rassembler tous les éléments essentiels de ce sujet dans un seul ouvrage. Il a également fait preuve d'une grande compétence dans l'illustration de ses théories, grâce à une collection de 77 figures très détaillées.

# PRATIQUE MÉDICO-CHIRURGICALE

MÉDECINE ET CHIRURGIE GÉNÉRALES ET SPÉCIALES  
OBSTÉTRIQUE, PUÉRICULTURE, HYGIÈNE  
MÉDECINE LÉGALE, ACCIDENTS DU TRAVAIL, PSYCHIATRIE  
CHIMIE ET BACTÉRIOLOGIE CLINIQUES, ETC.

## Directeurs :

E. BRISSAUD, A. PINARD, P. RECLUS

PROFESSEURS À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Secrétaire général : HENRY MEIGE

## Collaborateurs :

ALLARD, BACH, BAUER, BAUMGARTNER, BOIX, BONNIER, BOUFFE DE SAINT-BLAISE, BOURGES, BRÉCY, CARRION,  
CHEVASSU, CHEVRIER, CLERC, COUVELAIRE, CROUZON, DOFTER, DUVAU, ENRIQUEZ, FAURE,  
FEINDEL, FIEUX, FORGUE, FRUHNSHOLZ, GOSSET, R. GRÉGOIRE, GRENET, HALLION, HERBET, JEANBAU, KENDRIDIY, LABEY,  
LAFONTE, LARDENOIS, LAUNAY, LECLÈNE, LENORMANT, LEPAGE, LEREBOULET, LONDE, DE MASSARY, H. MEIGE,  
MORAX, MOUTIER, OUI, PARSET, PÉCHIN, PIQUAND, POTOCKI, RATHERY, SAUVÉ, SAVARIAUD, SCHWARTZ, SÉE, SICARD,  
SOUQUES, TOLLEMER, TRÉMOLIÈRES, TRENEL, VEAU, WALICH, WIART, WURTZ.

6 volumes in-8<sup>e</sup>, formant ensemble 5.700 pages, abondamment illustrés, demi-reliure amateur, tête dorée, dos plat, fers spéciaux. — Prix des 6 volumes . . . . . 110 fr.

\* L'étudiant ou le praticien doit remuer bien des volumes et feuilleter bien des tables de matières avant de trouver, dans nos *Traits de médecine, de chirurgie, d'accouchement et d'hygiène*, le renseignement dont il a besoin. Il économiserait son temps, il s'épargnerait beaucoup d'impatience s'il avait sous la main un ouvrage qui prende la substance de ce qu'il veut savoir sur l'heure. Mais un tel précis n'existe pas; nous avons eu l'idée de l'entreprendre.

a Pour être d'un maniement facile, notre Pratique Médico-chirurgicale adopte l'ordre alphabétique; pour ne pas être trop encombrante elle supprime les notes, les historiques fastidieux, les bibliographies superflues; pour être vraiment utile, elle est surtout clinique et thérapeutique; elle ne donne de l'anatomie pathologique et de la pathogénie que ce qu'il faut pour interpréter les symptômes et pour diriger le traitement, but capital de nos efforts....

(EXTRAIT DE L'AVANT-PROPOS DES DIRECTEURS)

de phosphore et le phosphore rouge, et analogue à la dissociation des systèmes hétérogènes.

Les résultats du tableau sont encore plus frappants, si nous les représentons par une courbe; l'allure de cette dernière rappelle celle que l'on trouve dans tous les phénomènes du même ordre. (Voir fig. 2.)

De l'examen de cette courbe et du tableau sus indiqué, résultent quelques observations intéressantes :

Remarquons d'abord que, à 36°, par exemple, la tension de transformation du méthanal (44 millimètres) est quatre fois plus forte qu'à 6° (11 millimètres). Il en résulte que la proportion de gaz dans une atmosphère confinée, en présence de trioxyméthylène, pourra devenir quatre fois plus forte à 36° qu'à 6° et que, par suite, l'action antiseptique, pendant un temps donné, devra être au moins multipliée par le facteur 4. D'où la conclusion que, dans la pratique, au point de vue de la désinfection par l'aldéhyde formique, il y aura grand intérêt à éléver la température et que, toutes choses égales d'ailleurs, la désinfection doit être plus rapide en été qu'en hiver.

En outre, l'accroissement rapide de la transformation explique, étend et surtout précise nettement l'idée émise par Pottevin, que « l'élévation de température augmente considérablement le pouvoir bactéricide de l'aldéhyde formique<sup>1</sup> ». A 100°, en effet, la tension limite du méthanal est 27 fois plus forte qu'à 48°; c'est-à-dire que la proportion en est 27 fois plus considérable en atmosphère confinée. Si l'on considère, en outre, que beaucoup de germes secs supportent mal la chaleur seule, on est conduit à penser que l'action bactéricide du méthanal est beaucoup plus énergique aux températures élevées; puisque, à l'action de la chaleur, vient se superposer celle de l'aldéhyde et que celle-ci est nécessairement d'autant plus énergique que la proportion de gaz antiseptique devient plus considérable.

Ces expériences me conduisaient tout naturellement à étudier le pouvoir bactéricide de l'aldéhyde formique aux diverses températures. Mais ici se posait immédiatement la question du mode opératoire, le gaz méthanal étant désagréable à manier à cause de son odeur et possédant aux températures élevées une

1. POTTEVIN. Recherches sur le pouvoir antiseptique de l'aldéhyde formique. *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, page 807.

force élastique très marquée. Il devenait nécessaire d'imaginer une disposition expérimentale permettant, sans être incommodé, de faire séjourner les objets dans une atmosphère de méthanal sec, pendant un temps précis, à une température bien déterminée. A priori l'opération devait être réalisable, puisque la tension du gaz n'atteint jamais, même à 100°, la pression atmosphérique. Il était donc possible de concevoir un appareil fermant bien et présentant toute sécurité au point de vue de la marche des expériences. J'y suis arrivé par la disposition que je vais exposer maintenant.

## II

### APPAREIL A STÉRILISATION PAR LE MÉTHANAL RÉSULTANT DE LA TRANSFORMATION DU TRIOXYMÉTHYLÈNE SOUS L'ACTION DE LA CHALEUR SEULE

L'appareil que j'ai imaginé pour mes expériences se compose d'une étuve fermée, en cuivre, de forme cylindrique, entièrement entourée d'une double enveloppe remplie d'eau pour chauffage à 100° ou au-dessous. Dans quelques essais effectués à 110 et 120° et dont je ne parlerai pas, je remplaçais l'eau par de la glycérine ordinaire. La double paroi antérieure est traversée par des tubes cylindriques horizontaux en laiton, ouverts extérieurement dans l'atmosphère et intérieurement dans la chambre centrale. — Dans chacun de ces tubes fixes, glisse par frottement doux un tube mobile dont le diamètre extérieur est exactement du même calibre que le diamètre intérieur du tube fixe. — Une portion du tube mobile est échancrée comme suit : elle est coupée suivant deux génératrices du cylindre situées dans un plan parallèle au plan de symétrie horizontal et légèrement au-dessus de ce dernier; puis la partie supérieure est enlevée, au moyen de deux demi-sections droites, l'une antérieure, l'autre postérieure. Il reste ainsi une gouttière formée de la partie inférieure du cylindre et dans laquelle sont percées plusieurs ouvertures, pour offrir au gaz une pénétration facile; cette gouttière est fermée, à l'avant comme à l'arrière, par un disque de laiton soudé, qui obture complètement la partie principale du tube mobile. Les longueurs respectives de la gouttière et du tube fixe sont calculées de telle sorte que, quelle que soit la position du tube

mobile, il n'y ait jamais communication entre l'intérieur de l'étuve et l'atmosphère extérieure; la fermeture est, en effet, assurée par le disque métallique antérieur quand la gouttière apparaît extérieurement ou est complètement en dehors; un butoir empêche la sortie du tube mobile. — Ce dernier et sa gouttière constituent un véritable tiroir, au moyen duquel les objets à stériliser sont introduits ou retirés, sans que les vapeurs antiseptiques se répandent au dehors. Un bouton permet de les manœuvrer comme les tiroirs ordinaires; des tiges de laiton guident leur course et assurent l'horizontalité; un peu de vaseline lubrifie et permet le bon fonctionnement de l'appareil. Le tiroir du bas, dont la gouttière est restée pleine, reçoit du trioxyméthylène destiné à produire le méthanal pendant la chauffe.

L'appareil une fois porté à 100°, l'objet est placé dans l'une des gouttières, introduit dans la chambre par fermeture du tiroir, maintenu le temps voulu au contact du méthanal, enlevé par une manœuvre inverse; et les opérations peuvent être immédiatement et indéfiniment renouvelées.

Un autre stérilisateur, fondé sur le même principe, présente deux gouttières à chaque tiroir, l'une à l'avant, l'autre à l'arrière; la sortie de l'une produit l'introduction de l'autre. Cette disposition paraît plus avantageuse au point de vue de la solidité et de la facilité de construction.

Ces deux appareils ont fonctionné des journées entières dans mon laboratoire sans émettre la moindre odeur de méthanal; même en les maintenant plusieurs jours dans une armoire-étuve, successivement à 30, 40 et 50°, le résultat est semblable: on ne perçoit l'odeur d'aldéhyde qu'au moment de l'ouverture d'un tiroir, le gaz de la gouttière étant alors répandu au dehors; mais la quantité en est toujours minime, même à 100°. Enfin, une simple remarque montrera combien est parfaite la conservation du méthanal: depuis l'origine de mes travaux, qui datent de plusieurs mois, des centaines d'expériences ont été effectuées et je n'ai jamais eu à renouveler le trioxyméthylène; les quelques grammes introduits au commencement ont suffi à tous les besoins jusqu'à ce jour. Je n'ai eu qu'à me louer de ces appareils, de la façon dont ils fonctionnent et de la sécurité qu'ils présentent.

## III

## ACTION DU MÉTHANAL SEC, A LA TEMPÉRATURE DE 100°, SUR LES GERMES MICROBIENS LES PLUS RÉSISTANTS ET EN PARTICULIER SUR LE « BACILLUS SUBTILIS ».

Dans ces expériences de stérilisation, il était inutile de s'astreindre à employer des cultures pures. J'ai préféré m'adresser de prime abord à des liquides naturellement très infectés. Dans ce but, j'ai pris directement de l'eau d'égouts à l'usine élévatrice du Vieux-Port (quai de Rive-Neuve, n° 23), et j'ai opéré de la façon suivante :

*1<sup>re</sup> expérience.* — Des carnets de papier de 9,5 centimètres sur 6,5 centimètres à couverture épaisse et toile au dos, comprenant 8 feuillets, ont été badigeonnés intérieurement et extérieurement, sur toutes les pages et dans les plis de ces pages, avec de l'eau d'égouts de Marseille. Ils sont ensuite bien séchés à l'étuve à 35°, puis introduits dans mon appareil à stérilisation, pendant des temps exactement déterminés (à une seconde près).

Ces carnets sont ensuite abandonnés, pendant 24 heures, entre deux assiettes flambées, pour permettre la diffusion du gaz qui les imprègne à la sortie. Le lendemain, ils sont découpés aseptiquement entre les deux assiettes, puis introduits par petites portions, mais tout entiers (couvertures, bordures et feuilles) dans des tubes à essais de 24 centimètres de long et 2 centimètres de diamètre, renfermant du bouillon alcalinisé stérile.

Ces tubes sont ensuite portés à l'étuve à 38°-40° et examinés de jour en jour pendant six semaines consécutives.

En même temps, un carnet contaminé d'une façon identique, placé 5 minutes dans une étuve à 100°, sans méthanal, a été découpé et mis en tubes dans des conditions semblables.

*Résultats.*

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 5 minutes à 100°.	14	tous altérés le lendemain.
Expér. : 5 — —	24	aucune culture.
— 3 — —	23	—
— 2,5 — —	37	—
— 2 — —	48	—
— 1 — —	15	—

Devant un semblable résultat, je résolus d'opérer sur les spores les plus résistantes à la chaleur, celles du *Bacillus subtilis*. Pour cela, je fis une infusion de foin dans du bouillon et j'obtins rapidement le développement d'un voile abondant de *subtilis*. Cette culture comprenait évidemment d'autres microbes de toute espèce.

**2<sup>e</sup> expérience.** — Les carnets sont trempés dans ce liquide, en ouvrant successivement toutes les feuilles, de façon à obtenir une contamination aussi parfaite que possible, puis placés, pour dessiccation complète, à l'étuve à 35°. Ils sont ensuite exposés, à la façon ordinaire, aux vapeurs de méthanal, dans le stérilisateur, puis abandonnés une semaine dans le laboratoire entre deux assiettes flambées. Le 8<sup>e</sup> jour, ils sont découpés et mis en tubes; ces derniers sont placés à l'étuve et examinés de jour en jour pendant six semaines.

### Résultats.

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin: 5 minutes à 100° sans méthanal.	20	Tous altérés le lendemain.
Expér.: 10 — — avec —	24	Aucune culture.
— 8 — — —	21	— —
— 4 — — —	25	— —
— 3,5 — — —	19	— —
— 3 — — — —	30	22 stériles, 8 altérés.
— 2,5 — — — —	18	12 — 6 —
— 2 — — — —	17	13 — 4 —

Le même essai fut répété avec des étoffes imprégnées de la même culture.

**3<sup>e</sup> expérience.** — De vieux morceaux de drap, de flanelle, de tissu Rasurel, présentant de place en place des surjets ou plusieurs épaisseurs d'étoffe, sont trempés dans un mélange d'eau d'égouts et de culture de *subtilis*. On les maintient à 35°, sans les presser, afin de déterminer une culture superficielle en voile et de les infecter le mieux possible.

Les étoffes bien séchées sont traitées de la même façon que les carnets ci-dessus, découpées et mises en tubes.

*Résultats.*

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience
Témoin : 5 minutes à 100° sans méthanal.	12	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 5 — — avec —	37	Aucune culture.
4 — — —	46	— —
— 3 — — —	44	34 stériles, 10 altérés.
— 2 — — —	16	6 — 10 —

Ces résultats concordent complètement avec ceux indiqués ci-dessus pour les carnets.

Mais, en examinant les choses de plus près, je remarquai que, parmi les tubes altérés des expériences précédentes, il n'y avait aucune relation entre l'épaisseur des tissus et la résistance des germes: les bordures, les plis intérieurs des carnets, les portions d'étoffes qui présentaient plusieurs épaisseurs ne contaminaien pas plus les tubes que les feuillets intérieurs, les morceaux de couvertures ou les parties simples des tissus. Le gaz paraissait donc doué d'un pouvoir pénétrant considérable. J'étais conduit, par conséquent, à rechercher jusqu'où pouvait aller cette puissance de pénétration et, dans ce but, je fis la série d'essais suivants :

**4<sup>e</sup> expérience.** — Du coton hydrophile est trempé dans un mélange d'eau d'égouts et de culture de *subtilis*. Il est ensuite séché à 35°, mais sans avoir été pressé. On le découpe alors en lanières de 3 à 6 centimètres de largeur sur 15 à 18 centimètres de longueur. Ces lanières sont enroulées sur elles-mêmes, fortement tassées en rouleaux, comme les paquets de coton des pharmaciens, puis entourées de papier à filtre bien serré, et ficelées en croix.

5 de ces paquets, du poids de 3,5 grammes chacun et un 6<sup>e</sup> pesant 5 grammes sont exposés, dans l'appareil, à la vapeur de méthanal sec à 100°, respectivement pendant 5, 10, 15, 20 et 25 minutes.

Ces paquets sont ensuite abandonnés 7 jours dans le laboratoire, afin de permettre l'élimination complète du gaz antiseptique. Le 8<sup>e</sup> jour, ils sont ouverts aseptiquement, découpés entre deux assiettes flambées, et introduits intégralement en morceaux dans des tubes de bouillon alcalinisé stérile.

*Résultats.*

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 20 minutes à 100° sans méthanal.	16	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 25 — — avec —	16	Aucune culture.
— 20 — — —	15	— —
— 15 — — —	14	— —
— 10 — — —	15	— —
— 5 — — (3,5 Gs.)	16	— —
— 5 — — (5 Gs.)	15	— —

Il résulte de cette expérience que, en 5 minutes, on peut ainsi stériliser du coton, même en paquets ficelés.

Étant donnée cette pénétration rapide du méthanal, il était possible (et c'est ce que je fis dans les expériences qui suivirent), d'adopter un mode opératoire présentant une plus complète sécurité. Au lieu de découper la flanelle, après stérilisation, avec des ciseaux flambés, entre deux assiettes, je prépare d'avance les objets contaminés et je commence par les plier dans de petits carrés de papier à filtre. Je les assemble alors, dix par dix, dans d'autres morceaux de même papier, qui sont fermés et ficelés en croix.

Après passage dans l'appareil pendant un temps déterminé, ces paquets sont abandonnés 7 jours dans le laboratoire, ouverts aseptiquement par l'une de leurs extrémités; puis chacun des morceaux est extrait successivement et introduit directement dans le tube à culture, où il s'ouvre aussitôt de lui-même. Par ce moyen, les dangers de contamination sont de beaucoup réduits: les résultats sont identiques aux précédents. Ce mode opératoire fut appliqué dans les expériences relatées plus loin, pour les températures inférieures à 100°.

Un second essai relatif à la pénétration est le suivant :

5<sup>e</sup> expér. — Une série de tubes à essais, de petit diamètre, faits avec des tubes à dégagement gazeux, de 6 centimètres de longueur environ, reçoivent quelques gouttes du mélange contaminant (*subtilis* et égouts) que je laisse évaporer à sec. Je les ferme avec des tampons de coton, et je les maintiens respectivement 5, 10 et 20 minutes dans le stérilisateur à 100°. A leur sortie,

ils sont abandonnés 4 jours dans le laboratoire. Dans chacun d'eux, j'ajoute un peu de bouillon stérilisé et je mets à l'étuve.

### Résultats.

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 20 minutes à 100° sans méthanal.	4	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 20 — — avec —	16	Aucune culture.
— 10 — — —	45	—
— 5 — — —	45	—

Au bout de cinq semaines, le bouillon était entièrement évaporé, sans qu'il y ait eu culture apparente.

6<sup>e</sup> expérience. — Du sable fin est fortement mouillé avec de l'eau d'égouts et une culture de *subtilis*. Le mélange contaminant surnage le sable. Ce dernier est ensuite complètement séché à l'étuve à 35°, puis pulvérisé et mis en petits paquets, par portions de 1 gramme, dans du papier à filtre. 10 de ces paquets sont empilés et enfermés ensemble dans un autre morceau de papier semblable; le tout est ficelé en croix et exposé tel quel dans le stérilisateur à 100°.

Après les avoir laissés quelques jours dans le laboratoire, toute odeur ayant disparu, j'introduis chaque petit paquet dans un tube de bouillon stérile. Le papier s'ouvre et le sable tombe au fond. Je mets à l'étuve à 38-40°.

### Résultats.

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 20 minutes à 100° sans méthanal.	40	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 20 — — avec —	40	Aucune culture.
— 15 — — —	10	—
— 10 — — —	10	—
— 5 — — —	10	—
— 4 — -- —	10	—
— 3 — — —	10	8 stériles, 2 altérés.
— 2 — — —	10	5 — 5 —

Ici encore, la pénétration a été aussi facile qu'à travers le papier et les résultats sont absolument semblables à ceux qui correspondent aux carnets et aux étoffes,

On pouvait se demander s'il en serait de même avec de la terre bien compacte. On sait, en effet, quelles difficultés on rencontre à stériliser de la terre chargée de spores. Pour résoudre la question, je fis l'essai suivant :

*7<sup>e</sup> expérience.* — Une expérience identique à la précédente (6<sup>e</sup>) est effectuée avec de la terre glaise provenant des fouilles entreprises, pour placer les câbles de la compagnie du Gaz et d'Electricité. La terre glaise est bien imprégnée, de la même façon, au moyen du mélange contaminant en excès, puis séchée, pulvérisée, tamisée, et mise en paquets de 1 gramme. J'opère comme précédemment.

### Résultats.

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 20 minutes à 100° sans méthanal.	4	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 20 — — avec —	46	Aucune culture.
— 15 — — —	15	—
— 10 — — —	15	—
— 8 — — —	10	—
— 7 — — —	10	—
— 6 — — —	10	—
— 5 — — —	10	7 stériles, 3 altérés.
— 4 — — —	10	4 — 9 —
— 3 — — —	10	— 10 —
— 2 — — —	10	— 10 —

Dans ce dernier cas, le temps nécessaire à la stérilisation complète paraît un peu supérieur à celui des expériences précédentes. Cela se conçoit si l'on remarque que les intervalles compris entre les particules de la terre pulvérulente tassée constituent de véritables espaces capillaires, dans lesquelles le mouvement des gaz est extrêmement lent et pénible.

J'ai remarqué et je signale simplement le fait, que la plupart

des tubes altérés après un passage de 4 à 5 minutes dans mon stérilisateur renfermaient non du *subtilis*, mais uniquement des moisissures.

De tout ce qui précède, il résulte que l'exposition dans le méthanal sec, à 100°, détruit complètement, en 4 minutes au maximum, les spores sèches de *subtilis* et des autres germes qui l'accompagnent; en outre, la pénétration du gaz antiseptique est extrêmement rapide, aussi bien dans le sable ou le coton que dans les plis du papier ou la profondeur des étoffes. On conçoit *a priori* qu'il puisse en être ainsi. Le méthanal, à 100°, est en effet un gaz parfait, très éloigné de son point de liquéfaction ( $-21^{\circ}$ ); et comme il a sensiblement la même densité que l'air, sa diffusibilité est aussi du même ordre de grandeur. Partout où pourra se manifester un mouvement d'air, il y aura pénétration possible de l'aldéhyde formique.

Lorsqu'on effectue la stérilisation au moyen d'appareils à vapeur d'eau surchauffée à 115-120°, il est souvent difficile de faire pénétrer la vapeur dans les interstices de la laine ou du coton, et l'on est obligé de produire par instants de brusques détentes, afin d'entrainer les dernières parcelles d'air emprisonné. Cela s'explique par ce fait que la vapeur d'eau, comme tous les gaz voisins de leur point de liquéfaction, présente, à cette température, une certaine viscosité. Le méthanal, par contre, se trouve dans des conditions extrêmement différentes: il peut agir d'une façon plus certaine et plus efficace, d'abord parce qu'il est plus pénétrant, ensuite parce qu'il possède une antisepsie propre, ce qui n'existe pas pour la vapeur d'eau.

## IV

### INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTION ANTISEPTIQUE DU MÉTHANAL SEC

Aux températures inférieures à 100°, l'action du méthanal est encore très marquée. Il y aurait grand intérêt à déterminer d'une façon précise le temps minimum nécessaire à la stérilisation, surtout pour les températures ordinaires (20, 30, 40°), auxquelles s'effectuent généralement les désinfections. En employant mon stérilisateur, il est possible de résoudre la question dans tous les cas. Mais, sur ce point, les expériences

sont en cours, et j'en indiquerai les résultats dans un prochain mémoire.

Cependant, je vais d'ores et déjà donner ici quelques conclusions sur l'action à 90° : cette dernière est, en effet, très nette et confirme les précédents résultats.

Je citerai seulement les deux essais suivants :

**8<sup>e</sup> expérience.** — Des morceaux de flanelle contaminés par le mélange « égouts *subtilis* », séchés et mis en paquets, sont exposés, pendant des temps variables, dans le stérilisateur, à la façon ordinaire, à la température de 90°, puis mis en tubes 8 jours après.

### Résultats.

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 20 minutes à 100° sans méthanal.	10	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 20 — 90° avec —	10	Aucune culture.
— 15 — — —	10	— —
— 10 — — —	10	— —
— 8 — — —	10	— —
— — — —	10	8 stériles, 2 altérés.
— 5 — — —	10	7 — 3 —
— 4 — — —	10	5 — 5 —
— 2 — — —	10	Tous altérés.

La simple inspection de ce tableau montre nettement que, avant la stérilisation complète, il existe une période d'action relative, qui, bien qu'insuffisante, se manifeste par la diminution progressive du nombre des tubes altérés. Ce dernier est d'autant moins considérable qu'on se rapproche davantage du temps minimum nécessaire pour la stérilisation totale. Dans cette période, les germes ne sont pas encore tous détruits ; quelques-uns résistent à l'action du méthanal. Mais ces derniers sont de plus en plus rares au fur et à mesure que l'on approche du temps réel de la stérilisation.

En outre, si ces germes particulièrement résistants sont encore capables de se développer, ils n'en sont pas moins atteints dans leur vitalité ; leur culture est lente, pénible,

retardée : je m'en suis assuré en suivant leur développement de jour en jour et déterminant le moment où leur présence commence à se manifester par un trouble du bouillon ou un voile de *subtilis*, par exemple.

Dans l'expérience précédente, après 2 minutes d'action de l'antiseptique, 8 tubes sur 10 étaient altérés après 24 heures d'étuve ; après 4 minutes, 1 était altéré le 2<sup>e</sup> jour et les 4 autres le 3<sup>e</sup> jour seulement. Lorsque les paquets ont été maintenus 12 à 15 jours dans le bouillon, l'expérience est terminée ; quelques rares germes seulement se développent après le 15<sup>e</sup> jour.

9<sup>e</sup> expérience. — Des paquets renfermant de la terre glaise contaminée comme dans l'essai ci-dessus indiqué (7<sup>e</sup> expérience) ont été placés dans le stérilisateur à 90° et mis en tubes à la façon ordinaire.

### Résultats.

DURÉE DU SÉJOUR DANS L'APPAREIL	NOMBRE de tubes.	ÉTAT DES TUBES D'ESSAIS à la fin de l'expérience.
Témoin : 20 minutes à 100° sans méthanal.	10	Tous altérés le lendemain.
Expér. : 20 — 90° avec —	10	Aucune culture.
— 15 — — —	10	— —
— 10 — — —	10	9 stériles, 1 altéré.
— 5 — — —	10	1 stérile, 9 altérés.

Dans cette expérience, l'influence du gaz antiseptique et le retard de la culture se sont manifestés d'une façon très nette :

- 2 tubes étaient altérés le 3<sup>e</sup> jour.
- 1 tube était altéré le 6<sup>e</sup> —
- 2 tubes étaient altérés le 10<sup>e</sup> —
- 3 — — 14<sup>e</sup> —
- 1 tube était altéré le 21<sup>e</sup> —

Le 10<sup>e</sup> est resté stérile. 3 de ces tubes ont été envahis par des moisissures sans *subtilis*. Le tube, altéré après 10 minutes d'exposition au méthanal, renfermait également une moisissure, qui n'a poussé que le 18<sup>e</sup> jour. On retrouve ainsi la remarque déjà signalée de la résistance de certaines spores de moisissures dans la terre.

En résumé, la durée d'action pour une stérilisation complète, à 90°, dans le méthanal sec, est donc supérieure à celle qui correspond à 100° : 8 minutes au lieu de 4.

Dans le fait de la stérilisation à des températures égales ou inférieures à 100°, il y a lieu de faire entrer en ligne de compte deux actions différentes : d'abord celle du méthanal, nécessairement moins énergique quand la température baisse, puisque, la tension de transformation devenant plus faible, la masse active du gaz diminue en même temps. Mais cette action n'est certainement pas la seule : il résulte de mes essais aux diverses températures que les temps minima nécessaires à la stérilisation ne sont pas uniquement en raison inverse des tensions de transformation. La température ajoute donc son effet propre à l'action du méthanal, et cela se conçoit *a priori* : on sait que beaucoup de germes sont relativement peu résistants, même à l'état sec, à l'action de la chaleur seule. Il sera possible, je l'espère, avec des expériences assez nombreuses et suffisamment prolongées, de trouver une relation générale entre les temps nécessaires à la stérilisation, d'une part, et, d'autre part, la température et la tension de transformation correspondante du méthanal.

## V

### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

De tout ce qui précède, il résulte de la façon la plus évidente que, dans les stérilisations effectuées avec le méthanal, il faut tenir compte de la transformation du gaz en trioxyméthylène solide. Ce serait, je le répète, une illusion de penser que l'on peut injecter dans une enceinte, à une température déterminée, une proportion considérable de méthanal ; il n'est pas plus possible de le faire que d'y introduire une quantité de vapeur d'eau supérieure à la tension maxima.

On ne peut songer davantage, pour augmenter cette proportion, à employer le méthanal humide, le formol, par exemple ; car la tension de vapeur du formol, aux mêmes températures, est peu supérieure à celle de l'eau seule. Cela résulte nettement des mesures que j'ai effectuées dans les mêmes conditions et par comparaison avec les vapeurs de formol et celles de méthanal sec. J'ai introduit dans un tube de Torricelli quelques centi-

mètres cubes de formol et j'ai déterminé les tensions de vapeur correspondant aux divers degrés de l'échelle thermométrique. Les résultats, pour lesquels deux corrections ont été faites, celle de la température, d'une part, et, d'autre part, celle de la couche de formol évaluée en hauteur équivalente de mercure à 0°, sont indiqués dans le tableau suivant. Les chiffres de la 1<sup>re</sup> colonne (E) représentent les tensions maxima de la vapeur d'eau; ceux de la 2<sup>e</sup> (M), les tensions de transformation du trioxyméthylène sec; ceux de la 3<sup>e</sup> (F), les tensions de vapeur de la solution de formol.

Températures.	E Tensions maxima de la vapeur d'eau.	M Tensions de transf. du trioxyméthylène.	F Tensions de vapeur de formol.
18°	45 m/m	21 m/m	22 m/m
28	28 —	32 —	34 —
36	44 —	44 —	48 —
38	49 —	48 —	53 —
42	61 —	60 —	65 —
45	71 —	67 —	74 —
48	83 —	77 —	86 —
50	92 —	84 —	94 —

Les résultats de ce tableau sont représentés graphiquement par les trois courbes de la fig. 3.

L'expérience montre bien que, tout au moins jusqu'à 50°, la tension de vapeur du formol est de beaucoup inférieure à la somme des forces élastiques des deux corps en présence (eau et méthanal). Ce fait est d'ailleurs général : une substance fixe dissoute, d'après la loi de Raoult, abaisse toujours la tension de vapeur du dissolvant; mais si le corps dissous est très volatile, comme dans le cas actuel, ce dernier prend partiellement l'état gazeux. Cependant la tension qui en résulte, tout en restant supérieure à celle de l'eau, est bien inférieure à celle que prendrait le gaz, s'il était seul. C'est ainsi qu'une solution ammoniacale, renfermant une proportion considérable de gaz, n'a guère, à la température ordinaire, qu'une tension de 12 cen-

timètres de mercure environ, tandis que le gaz ammoniac liquéfié possède, dans les mêmes conditions, une force élastique de 9 atmosphères.

Il en résulte que les solutions de formol, au point de vue de la désinfection, ne peuvent guère fournir de méthanal que

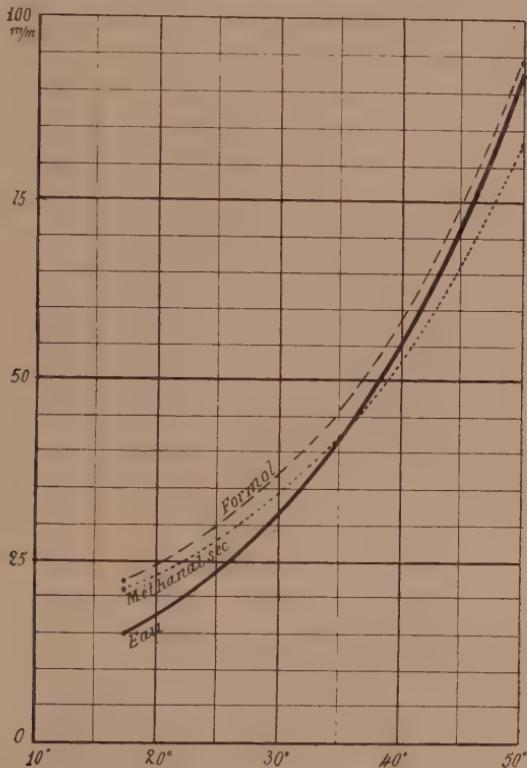


Fig. 3. — Courbes des tensions de vapeur entre 18° et 50°.

par évaporation du dissolvant ; l'excès d'eau est donc, pour la stérilisation des germes, plutôt un obstacle qu'un adjuvant. Ces résultats ont un intérêt pratique et méritaient d'être signalés.

Ce point acquis, l'expérience montre que le méthanal est un antiseptique d'autant plus efficace que la température est plus élevée, et cela pour les raisons exposées ci-dessus. Dans la pratique de la désinfection, il y aura donc grand intérêt à éléver la température des appartements et cela par tous les procédés possibles.

Enfin, s'il s'agit d'objets que l'on peut introduire dans une enceinte close, l'appareil que j'ai décrit plus haut rendra de grands services à cause de la sécurité qu'il présente, de la stérilisation certaine qu'il permet et de la rapidité avec laquelle les opérations peuvent se succéder.

J'ai constaté en outre, que les étoffes de soie des nuances les plus délicates, les couleurs, les encres de toute espèce, le papier le plus blanc ne sont nullement modifiés par une exposition de 3 à 5 minutes aux vapeurs de méthanal sec, à 100°. Un stérilisateur ainsi compris est donc susceptible de nombreuses applications pratiques. On peut l'utiliser, par exemple, pour la désinfection des livrets de caisses d'épargne au moment des dépôts, des billets de banque, des livres, des instruments de chirurgie pendant les opérations mêmes, des objets de pansements, des ciseaux et brosses de coiffeurs, etc.

Il serait possible de réaliser également un semblable modèle à coulisses formées de deux cylindres glissant l'un dans l'autre pour la désinfection rapide des objets de grandes dimensions, comme matelas, étoffes, vêtements, etc. Un tel stérilisateur présenterait une sécurité complète, un maniement commode et une remarquable rapidité de manipulation.

En terminant, je tiens à adresser mes remerciements à mon préparateur, M. Ricard, qui m'a aidé dans ces expériences avec beaucoup d'intelligence et de dévouement.

---

# ACTIONS DIASTASIQUES REVERSIBLES

Formation et dédoublement des  
éthers-sels sous l'influence des diastases  
du pancréas.

PAR HENRI POTTEVIN

---

Le premier exemple d'une diastase, ou d'un mélange de diastases, capable d'effectuer selon les conditions de milieu qui lui sont faites, deux actions inverses : l'une de dédoublement, l'autre de synthèse, a été signalé en 1898 par M. Croft Hill<sup>1</sup>. Depuis, ce savant a repris et précisé ses observations, tandis que de divers côtés on constatait des faits analogues avec d'autres produits diastasiques. Mais, ainsi qu'on le verra par le court historique qui va suivre, outre que l'existence d'une action reversible ne ressort pas toujours, sans conteste, des expériences rapportées, dans les cas même où elle ne semble pas douteuse, elle ne se manifeste qu'avec une activité faible et ne fournit que des rendements médiocres, si bien que, presque jamais, le produit synthétique n'a été obtenu en quantité suffisante pour que sa constitution chimique puisse être complètement établie.

Les extraits de levure, préparés selon le procédé indiqué par Fischer<sup>2</sup>, contiennent de la maltase et par ce fait sont capables de dédoubler la molécule de maltose, avec fixation de  $H^2O$ , en deux molécules de glucose. Inversement, si on abandonne pendant plusieurs semaines à la température ordinaire une solution concentrée de glucose (40 à 60 %) dans l'extrait de levure, on peut constater que son pouvoir rotatoire va en augmentant, tandis que son pouvoir réducteur diminue. Cela peut s'interpréter en admettant qu'il se forme un produit de condensation qui, comme le maltose ou les dextrines, donne, à poids égal, des solutions ayant un pouvoir rotatoire plus élevé et un pouvoir réducteur plus faible que celles de glucose. Tel est le fait

1. CROFT HILL, *Reversible Zymohydrolysis*, *Transact. of the Chem. Soc.*, 1898, 634.

2. E. FISCHER, *Berichte*, 1894, 27, 1479 et 1895, 28, 1430.

observé en 1898 par Hill et vérifié depuis par lui-même, par Emmerling, etc... Hill s'est assuré en outre que le phénomène ne se produit pas si on opère dans les mêmes conditions avec de l'extrait de levure bouilli. Quant à la nature des corps qui prennent réellement naissance, elle reste incertaine.

Dans ses premiers essais, Hill avait trouvé que les variations des pouvoirs rotatoire et réducteur étaient l'une par rapport à l'autre ce qu'elles auraient dû être s'il s'était formé uniquement du maltose. Comme d'autre part la transformation diastasique semblait aboutir au même état d'équilibre, que la solution initiale fût faite de maltose ou de glucose, et que le produit final traité par la phénylhydrazine lui donnait une biose-osazone semblable à la maltosazone, il avait conclu que l'action réversive s'exerçait selon la formule simple



Depuis<sup>4</sup>, il a trouvé que les choses ne se passent pas aussi simplement, et notamment que la concordance observée la première fois, entre les variations des pouvoirs rotatoire et réducteur, doit être considérée comme fortuite. En éliminant par le S. Marxianus (qui fait fermenter le glucose, mais n'attaque pas le maltose) le glucose en excès, on obtient un résidu qui constitue le produit formé sous l'action de la diastase et présente les caractères suivants :

4° Mis en solution étendue au contact de la maltase, il devient, en partie du moins, fermentescible par le S. Marxi-a-nus:

2<sup>e</sup> Une petite quantité fermentée sous l'influence de toutes les levures de maltose et est probablement du maltose :

3<sup>e</sup> La plus grande partie est inattaquable par presque toutes les levures qui font fermenter le maltose, mais paraît légèrement attaqué par quelques-unes. Elle est constituée par un peu de substances dextrineuses et surtout par un sucre qui a été isolé sous forme d'une masse confusément cristallisée, d'un goût sucré, douée d'un pouvoir rotatoire  $\alpha_d = + 91\%$ . L'osazone, qui d'après l'analyse est une biose-osazone, fond à 173-174; elle est douée du pouvoir rotatoire  $\alpha_d = + 7\%$ .

1. CROFT HILL, *Reversibility of Enzyme of ferment action*. *Transact. of. Chem. Soc.*, 1903, I, 578.

Hill pense, en définitive, qu'il se forme une petite quantité de maltose et de dextrine avec une quantité plus grande de l'autre biose, qui n'a pu être identifié à aucun sucre connu et qu'il appelle Revertose.

En répétant les expériences de Hill, dans des conditions à peu près identiques, Emmerling<sup>1</sup> a trouvé aussi qu'il se formait un biose non fermentescible par la levure de bière, dont il n'a obtenu que l'osazone (deux expériences lui ont fourni en tout 1<sup>gr</sup>.2 d'osazone) et qu'il pense, d'après les propriétés de celle-ci, être l'Isomaltose de Fischer.

De ces travaux on peut bien conclure que le glucose donne naissance, sous l'influence de l'extrait de levure, à des produits de condensation comprenant des dextrines et un ou plusieurs bioses : la présence des dextrines qui met obstacle à l'obtention des osazones caractéristiques et des bioses cristallisés, faisant que ceux-ci n'ont pu être définis avec certitude ; mais quant à interpréter la formation de ces corps par une action *renversée* de la maltase ou d'une autre diastase de la levure, on se heurte à une grosse difficulté provenant de ce qu'ils sont, en majeure partie, inattaquables par les levures même dont l'extrait peut servir à les préparer.

La maltase de la levure dédouble l'amylgdaline en glucose et nitrile amygdalique. Inversement, Emmerling<sup>2</sup>, en exposant à la température de 35° pendant 3 mois une solution de : nitrile amygdalique, 3<sup>gr</sup> grammes; glucose, 18<sup>gr</sup>.5; dans 50 c. c. d'extrait de levure additionné d'un peu de toluène, a obtenu, dans un cas, 0<sup>gr</sup>.5, dans un autre 0<sup>gr</sup>.35, d'une substance présentant les caractères de l'amylgdaline.

La lactase des grains de képhyr dédouble le lactose en glucose et galactose. Inversement Fischer et Armstrong<sup>3</sup> en exposant à la température de 33° pendant 5 semaines une solution de : glucose, 100 grammes; galactose, 100 grammes; dans 200 c. c. d'extrait de levure, ont vu la rotation qui était de 20°,7 au début, tomber à 17°,3 : une partie de la solution ayant alors été diluée et laissée à l'étuve, son pouvoir rotatoire est allé augmentant.

1. EMMERLING, *Synthetische Wirkung der Hefenmaltase* : Berichte, 1901, 34, 602.

2. EMMERLING, *Synthetische Wirkung der Hefenmaltase* : Berichte, 1901, 34, 3810.

3. E. FISCHER et FRANKLAND ARMSTRONG, *Synthese einige neuer dissacharide* Berichte, 1902, 3144.

Après élimination du glucose et du galactose en excès, par la levure de bière, ils ont obtenu un résidu renfermant un biose qu'ils n'ont pas isolé, mais dont ils ont fait l'osazone. Ce sucre n'a pu être identifié à aucun des sucres connus; Fischer et Armstrong l'ont appelé Isolactose<sup>1</sup>.

Kastle et Löwenhardt<sup>2</sup> ont observé la formation de butyrate d'éthyle par union de l'acide et de l'alcool en présence des diastases du pancréas. Ils citent une seule expérience qui est la suivante :

Un mélange composé de :

Acide butyrique en solution deci-normale.....	900
Extrait aqueux de pancréas (grossièrement filtré et trouble)....	500
Alcool éthylique à 93°.....	50
Thymol.....	2

a été maintenu à la température de 23-27° pendant 40 heures, après quoi on a pu en séparer par distillation dans un courant d'acide carbonique, 25 c. c. d'un liquide contenant, avec de l'alcool et de l'acide butyrique en excès, du butyrate d'éthyle reconnaissable à son odeur. En versant le liquide ainsi obtenu dans l'eau qui dissout l'alcool et l'acide, on a recueilli 1 c. c. d'une huile rosée constituée par du butyrate d'éthyle impur. On

1. Depuis que mon manuscrit avait été remis à la rédaction des *Annales*, j'ai connu, par l'analyse qu'en a donné M. ABT. (*Bull. Instit. Past.*, 30 avril 1906) au travail de Armstrong sur la condensation moléculaire du glucose, en présence de la maltase et de l'émulsine.

Armstrong, en opérant dans les mêmes conditions que les auteurs déjà cités, a observé :

1<sup>o</sup> Par condensation moléculaire du glucose dissous dans une macération de levure, la formation d'un biose réducteur dont l'osazone serait identique à l'isomaltosazone et qui serait lui-même l'Isomaltose.

Cet Isomaltose est hydrolysé par l'émulsine;

2<sup>o</sup> Par condensation du glucose, en présence de l'émulsine, la formation d'un corps réducteur qui serait le maltose (mêlé peut-être d'un peu d'isomaltose).

Pour interpréter ces résultats, Armstrong admet : d'une part que le maltose et l'isomaltose sont l'un par rapport à l'autre les deux stéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  d'un même glucoside; d'autre part que toute solution de glucose contient un mélange des deux formes  $\alpha$  et  $\beta$ ; pour chaque diastase la fonction hydrolytique prédominerait vis-à-vis d'une classe de dérivés, tandis que la fonction synthétique prévaudrait vis à vis de l'autre.

Mais l'hypothèse des relations stéréoisomériques entre le maltose et l'isomaltose n'est appuyée par aucune donnée de fait. Sans entrer dans la discussion de l'ingénieuse théorie d'Armstrong, je ferai remarquer qu'elle laisse de côté le Revertose de Hill et qu'elle n'expliquerait pas pourquoi, dans les expériences de Emmerling, l'émulsine qui dédouble l'amylgdaline en glucose et nitrile amylgdalique, détermine, lorsqu'elle agit sur un mélange de ces deux corps, la formation de l'amylgdaline elle-même et non celle de son stéréoisomère.

2. KASTLE et LOEWENHARDT, *American Chemical Journal*, 1904, 24, 491.

n'a pu, vu la faible quantité, songer à le purifier, mais on a constaté : 1<sup>o</sup> qu'une portion mise en présence d'une solution pancréatique s'acidifie ; 2<sup>o</sup> qu'une autre portion traitée par la soude, évaporée à sec, traitée par l'acide sulfurique dégage l'odeur de l'acide butyrique. Une expérience faite simultanément, dans des conditions identiques, mais avec un extrait de pancréas bouilli, n'a donné que des traces d'éther butyrique.

Hanriot<sup>1</sup> a constaté que l'acide butyrique s'unit à la glycérine sous l'action de la sérolipase. Pour essayer d'isoler la butyrine, ce savant a opéré sur 12 grammes d'acide butyrique dilués dans 24 litres d'eau, 24 grammes de glycérine et 2 litres de sérum de cheval. Le mélange étant maintenu à 37°, au bout de 4 heures l'acidité était tombée à moitié, on a rajouté 6 grammes d'acide butyrique, puis après quelques heures on a épuisé par l'éther, celui-ci a été ensuite lavé à la potasse et distillé. « Le résidu a donné 3 grammes d'un liquide bouillant entre 170 et 200° à peine acide, et un résidu non distillable pesant environ le menu poids. On en a eu trop peu pour pouvoir le fractionner, mais, et c'est là le point important, on a pu constater que ces deux corps dissous dans l'eau et traités en solution neutre par la lipase se dédoublaient comme fait la butyrine. »

Il est à remarquer que, dans les conditions opératoires où MM. Kastle et Lœwenhardt et M. Hanriot avaient dû se placer, les rendements ne pouvaient, théoriquement, être que des plus médiocres. En effet, le raisonnement indique que les diastases interviennent dans les réactions chimiques pour en modifier la vitesse, mais non les limites d'équilibre, celles-ci dans le cas particulier de la formation et de la saponification des éthers-sels étant déterminées uniquement par les proportions relatives d'alcool, d'acide, d'éther et d'eau qui se trouvent en présence. Or, MM. Berthelot et Pean de Saint-Gilles<sup>2</sup> ont montré que dans les solutions aqueuses étendues, la proportion d'acide éthérifié est toujours très faible; pour des systèmes comprenant : eau, 95; alcool, 5; acide, de 1,6 à 13,8, elle reste sensiblement invariable, allant seulement de 7,3 à 8,2 pour 100, de l'acide mis en œuvre.

1. HANRIOT, *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1901, 1, 212.

2. BERTHELOT et PEAN DE SAINT-GILLES, *Annales de Chimie et de Physique*, 3<sup>e</sup> série, t. LXVIII.

Dans un certain nombre d'observations, divers savants ont conclu à l'existence d'une action hydrolytique renversée, d'après les changements survenus dans le milieu mis en expérience, sans avoir caractérisé directement l'existence et la nature du produit de synthèse; ce sont celles de MM. Hill<sup>1</sup>: formation de produits de condensation du glucose sous l'action de la taka-diastase et des diastases du pancréas; Fischer et Armstrong<sup>2</sup>: condensation du glucose par la kephyr-lactase, du glucose et du galactose par l'emulsine; Acree et Hinkins<sup>3</sup>: fixation de l'acide acétique sur le glucose par les diastases pancréatiques; Arie W. Wiser<sup>4</sup>: formation de saccharose par l'action de l'invertine sur un mélange de glucose et de Lévulose, de salicine par action de l'émulsine sur un mélange de glucose et de saligénine.

Je laisse de côté, à dessein, pour me cantonner dans le domaine des diastases hydrolysantes, les travaux publiés sur les actions alternativement oxydantes et réductrices, ainsi que les belles recherches effectuées dans ces derniers temps sur la rétrogradation de l'amidon par MM. A. Fernbach, Maquenne et Wolf. Il s'agit dans les deux cas de phénomènes très complexes qui exigeraient une discussion minutieuse et qui n'ont pas de rapport direct avec ceux qui font l'objet de mon travail.

De tout ce qui précède, il faut conclure, en définitive, que la notion même de l'existence des phénomènes de reversion repose sur des observations qui, en raison des circonstances expérimentales complexes et de l'incertitude qui persiste sur la nature des produits synthétiques obtenus, ne sont pas toujours à l'abri des difficultés d'interprétation.

Je m'étais proposé, en 1903, de chercher une action diastasique reversible, dont l'observation fut facile et ne laissât place à aucune incertitude. Comme MM. Kastle et Löwenhardt, et M. Hanriot, je m'étais adressé aux phénomènes d'étherification, mais en me placant dans les conditions où on devait, théoriquement, obtenir des rendements élevés, c'est-à-dire en éliminant autant que possible l'eau des systèmes en réaction. Je constatai<sup>5</sup> que le tissu pancréatique devient alors un agent

1. HILL, *Chemie Soc., loc. cit.* 1903.

2. FISCHER et ARMSTRONG, *Loc. cit.*

3. ACREE et HINKINS, *American. Chem. Journ.*, 1902, 28, 370.

4. ARIE et WISER, *Proced. K. Acad. Wetensch.*, Amsterdam, 1904, 6, 605.

5. H. POTTEVIN, *Acad. des Sciences*, 18 mars 1903 et 8 février 1904.

d'éthérification extrêmement actif, ne le cédant en rien comme facilité de mise en œuvre et comme rendement à ceux qui sont d'un usage courant dans la technique chimique. Le procédé d'éthérification par les diastases du pancréas me paraît appelé à rendre des services, en particulier dans les cas où on a affaire à des molécules d'alcool ou d'acide que la chaleur ou les acides minéraux peuvent altérer. L'objet de ce mémoire est d'exposer avec les détails nécessaires mes expériences anciennes et celles par lesquelles je les ai complétées depuis.

\* \* \*

Dans ma première note j'ai signalé la formation de monoléine par l'action de l'acide oléique sur l' « extrait glycériné de pancréas » ; je désignais ainsi le liquide trouble que l'on obtient en filtrant sur une toile fine la macération de 100 grammes de pancréas de porc finement haché, dans 250 c. c. de glycérine neutre à 28°. Plus tard j'ai constaté que, si on ajoute à la macération glycérinée la quantité d'eau juste suffisante pour qu'elle passe facilement au travers d'un filtre de papier, le liquide clair filtré est dépourvu de toute propriété lipogénique ; au contraire, les particules solides restées sur le filtre sont actives, mises en suspension dans des mélanges d'acide oléique et de glycérine ; elles déterminent l'éthérification, sans d'ailleurs que la substance agissante entre en solution dans le mélange qu'elle transforme.

Je ne me suis pas préoccupé de chercher à dissoudre la diastase, pour toutes les expériences que je citerai dans ce mémoire, j'ai utilisé le ferment insoluble contenu dans le tissu pancréatique : celui-ci étant au préalable déshydraté et dégraissé par un traitement à l'alcool et à l'éther.

Pour préparer le tissu en vue des expériences, on prend des pancréas de porc prélevés aussitôt que possible après l'abattage. La glande, séparée avec soin des tissus environnants, est très finement hachée et pulpée, puis mise en suspension dans deux fois son poids d'alcool à 95°; après deux heures de contact on filtre sur papier ; le résidu resté sur le filtre est repris et traité successivement, dans les mêmes conditions, une fois par l'alcool à 95°, une fois par un mélange en parties égales d'alcool et d'éther, deux fois par l'éther. Après le dernier traitement, l'excès d'éther est chassé à basse température et le tissu reste

sous forme d'une masse sèche, râche au toucher, facile à broyer dans un moulin : broyée, elle donne une poudre d'un emploi très commode et qui, conservée dans des flacons bouchés à l'émeri, garde très longtemps ses propriétés. J'ai essayé, au point de vue lipolytique et lipogénique, des échantillons vieux de vingt mois, ils étaient encore très actifs.

\* \*

*Acide oléique et alcool méthylique.* — En saponifiant l'huile d'olive par l'oxyde de plomb, reprenant par l'éther l'oléate métallique qu'on décompose ensuite par l'acide chlorhydrique, on obtient un acide oléique qui renferme comme impuretés une petite quantité d'autres acides gras (stéarique et palmitique); pour l'avoir tout à fait pur il faut recourir au traitement long et délicat indiqué par Gotlieb : cristallisations répétées de l'oléate de baryte dans l'alcool et décomposition du savon barytique par l'acide tartrique, dans une atmosphère de gaz carbonique.

Les expériences que nous avons en vue ne nécessitent nullement l'emploi d'un acide oléique rigoureusement pur, car d'une part : les conclusions qu'elles comportent en ce qui touche la synthèse des corps gras par la lipase pancréatique, seront tout aussi bien établies que l'on opère avec l'un quelconque des acides oléique, stéarique, palmitique ou avec un mélange en parties aliquotes des trois ; d'autre part : on n'introduit pas dans les calculs une cause d'erreur notable, si on considère comme pur un acide oléique qui contient en réalité 10 0/0 d'acide palmitique ; le poids d'acide nécessaire pour saturer une molécule-grammes d'alcool ou d'alcali est en effet de 282 grammes dans le premier cas, de 279 grammes dans le second. J'ai donc employé soit des acides préparés comme je l'ai dit en partant de l'huile d'olive, soit de l'acide oléique pur du commerce, après m'être assuré que leur poids moléculaire était compris entre 282 et 279 ; je n'ai jamais observé de différences dans la marche des opérations ou dans les résultats.

*Expérience I.* — L'éthérification de l'acide oléique avec l'alcool méthylique se fait bien, même quand on met en présence de l'acide une solution hydro-alcoolique assez étendue ; cette particularité va nous permettre d'opérer la destruction de la diastase dans l'essai témoin, en chauffant le tissu dans l'eau sans être obligés d'éliminer ensuite celle-ci.

J'ai préparé des mélanges contenant.

Numéro de l'essai.	Acide oléique en grammes.	Alcool méthylique en grammes.	Eau distillée en grammes.	Tissu en grammes.
1	100	0	22	5
2	100	11,5	22	5
3	100	11,5	22	5

Dans le cas du mélange 2, le tissu et l'eau distillée, placés dans le flacon qui doit contenir le tout, ont été chauffés à l'autoclave à 111° pendant 10 minutes; l'acide oléique et l'alcool ont été ajoutés après refroidissement. Les mélanges, bien agités, sont constitués par une émulsion assez volumineuse que surmonte une couche huileuse homogène et qui laisse au dessous d'elle un peu de liquide aquieux; aussitôt faits, ils sont mis à l'étuve à 33°. Des dosages d'acidité faits à l'origine, puis à intervalles réguliers, permettent de suivre la marche de l'éthérification; pour chaque dosage on prélève, après agitation, dans la couche huileuse supérieure. 2 grammes de liquide, qui sont dissous dans 10 grammes d'alcool à 95° et saturés par la soude normale en présence de phenol-phthaléine. Les nombres du tableau ci-dessous indiquent, en centimètres cubes, les quantités de liquide alcalin employées pour chaque prise :

Temps écoulé depuis l'origine.	Essai I.	Essai II.	Essai III.
0	6,3	6,2	6,2
15 heures.	6,3	6,1	5,1
39 —	6,2	6,0	4,4
64 —	6,1	5,9	3,3
95 —	6,1	5,8	2,6
118 —	6,2	5,9	2,2
190 —	6,0	5,8	4,6

Les quantités d'acide éthérifiées, sur les 100 grammes mis en œuvre, se trouvent donc être, après 8 jours de contact:

Dans l'essai I : Acide + alcool.....	4 gr. 2
— II : Acide + alcool + tissu chauffé...	6 gr. 2
— III : Acide + alcool + tissu.....	74 gr. 2

J'établirai plus loin que tout en exerçant son action éthérifiante, le tissu pancréatique ne cède rien de ses propriétés diastasiques au liquide ambiant et se retrouve à la fin de l'opération exactement aussi actif qu'à l'origine.

Pour isoler l'oléate de méthyle, on pourrait, comme je l'avais fait dans mes premières expériences sur les oléines, reprendre par un peu d'éther le mélange d'oléate et d'acide, saturer l'acide par la chaux éteinte et épouser par l'éther qui abandonne, après distillation, l'oléate alcoolique. Cette méthode présente un inconvénient provenant de ce que l'oléate de chaux n'est pas insoluble dans l'éther, surtout en présence d'autres composés

oléiques, il est entraîné en proportions notables et se retrouve à la fin dans l'oléate alcoolique d'où on n'arrive pas à l'éliminer complètement.

J'ai trouvé plus simple et plus avantageux d'opérer de la façon suivante, en mettant à profit le fait que les éthers de l'acide oléique sont peu solubles dans l'alcool (éthylique), et moins encore dans les mélanges hydro-alcooliques, qui dissolvent au contraire aisément les savons alcalins. Le mélange d'oléate de méthyle et d'acide, qui peut entraîner aussi un peu d'alcool méthylique, est dissous dans l'alcool (éthylique) à 95° et neutralisé exactement avec une solution de soude normale ; on ajoute ensuite suivant le cas de l'eau ou de l'alcool de façon que les quantités ainsi introduites, en tenant compte de l'alcool employé pour la dissolution première et de l'eau apportée par la neutralisation constituent un mélange à parties égales (alcool à 50 0/0) et se trouvent en proportion suffisante pour dissoudre la totalité du savon alcalin. Par le repos, l'oléate de méthyle se sépare et vient surnager la solution hydro-alcoolique, on le décante ; il entraîne du savon qu'on enlève par des lavages répétés avec de l'alcool à 50 0/0. En employant pour ces lavages l'alcool dilué et non l'eau pure, on évite les émulsions extrêmement tenaces qui se produiraient avec celle-ci. Quand il ne reste plus de savon, on lave à l'eau distillée pour enlever un peu d'alcool qui pourrait rester dans l'oléate. On arrive par ce procédé à préparer des éthers oléiques qui ne donnent pas 1 p. 4000 de cendres.

Le reste de l'essai III a fourni 69 grammes d'oléate de méthyle neutre, densité à 20° 0,883 ; 2gr.302 brûlés laissent 2 milligrammes de cendres.

La petite quantité d'oléate de méthyle formée dans les essais I et II n'a pu être isolée, elle ne se sépare pas de la solution hydro-alcoolique de savon.

J'ai caractérisé l'oléate obtenu dans l'essai III en le saponifiant et en dosant isolément chacun de ses composants acide et alcool.

30gr. 253 d'oléate ont été saponifiés en tube scellé, par la chaux éteinte ; en décomposant le savon de chaux par l'acide chlorhydrique, j'ai récupéré l'acide oléique. L'alcool a été repris du liquide aqueux, concentré par distillations successives et ramassé dans une petite quantité de liquide qui occupait un volume de 12 c. c. avec une densité de 0,950 à 45° ; sur une dilution j'ai fait les déterminations suivantes pour comparer la densité à la tension capillaire :

Densité à 45° .....	0,988
Nombre de gouttes au compte-gouttes de Duclaux ....	424
Nombre de gouttes calculé d'après la densité pour alc. méthyl.....	425

J'ai obtenu en définitive :

Acide oléique :  
28 gr. 01 au lieu de 28 gr. 82 calc. pour 30 gr. 253 d'oléate de méthyle.  
Alcool méthylique :  
3 gr. 14 au lieu de 3 gr. 27 calc. pour 30 gr. 253 d'oléate de méthyle.

L'expérience II montre ce que deviennent la vitesse et la limite d'éthérification lorsqu'on met en présence une molécule

d'acide oléique et une molécule d'alcool méthyllique, celle-ci se trouvant diluée dans une quantité plus ou moins grande d'eau.

*Expérience II.* — J'ai préparé et mis à 33°, les mélanges suivants :

	Acide oléique.	Alcool méthyl.	Eau dist.	Tissu.
1	50 gr.	5 gr. 7	0 gr.	2 gr. 5
2	50 gr.	5 gr. 7	7 gr.	2 gr. 5
3	50 gr.	5 gr. 7	14 gr.	2 gr. 5
4	50 gr.	5 gr. 7	35 gr.	2 gr. 5
5 <sup>1</sup>	50 gr.	5 gr. 7	70 gr.	2 gr. 5
6	50 gr.	5 gr. 7	140 gr.	2 gr. 5

Les essais 1 et 2 ont été faits avec des témoins pour lesquels le tissu était délayé dans quatre fois son poids d'eau, chauffé à l'autoclave à 110° pendant 10 minutes, puis desséché à 100° avec le produit d'évaporation du liquide dans lequel il avait été chauffé.

J'ai suivi la marche de l'éthérification comme dans l'expérience I. Les nombres du tableau indiquent les quantités d'acide éthérifié pour 400.

	1		2		3	4	5	6
	Diast.	Tem.	Diast.	Tem.				
Après 12 heures.	15	»	12	»	40	»	»	»
— 36 —	40	»	35	»	32	23	17	»
— 60 —	60	»	52	»	45	35	27	»
— 4 jours.	75	»	68	»	60	46	32	9
— 6 —	83	»	76	»	70	53	»	»
— 8 —	84	»	78	»	73	54	38	41
— 10 —	85	»	79	»	74	»	»	»
— 14 —	85	9	80	7,5	74	53	40	13

Dans chacun des essais 4 à 5, j'ai repris la partie qui n'a pas servi aux dosages d'acidité et j'ai séparé l'oléate de méthyle.

Les expériences I et II mettent en évidence, avec une netteté absolue, les propriétés éthérifiantes du tissu pancréatique. Elles s'exercent même, fait assez inattendu, en présence des solutions alcooliques diluées; dans l'essai 5 de l'expérience II avec une solution à 8 p. 100, en poids, la proportion d'acide éthérifié atteint 40 p. 100. Il semble qu'il y ait une contradiction entre ces résultats et ceux que j'ai rappelés plus haut, de M. Berthelot. Elle n'est qu'apparente; en réalité les uns et les autres se rapportent à des phénomènes qui ne sont pas comparables. On

1. Pour les essais 5 et 6 j'ai employé de l'eau distillée additionnée de 1/2000 d'aldéhyde formique.

ne peut pas inférer, de ce qui se passe dans le cas de mélanges hétérogènes, comme ceux des expériences I et II où, si l'un des deux corps réagissants, l'alcool est en solution dans l'eau, l'autre, l'acide, n'y est pas.

Les propriétés saponifiantes du tissu pancréatique sont depuis longtemps connues, aussi me bornerai-je, pour démontrer qu'il est capable de dédoubler les corps auxquels il a donné naissance, à rapporter deux essais; ils ont été effectués dans des conditions comparables à celles des essais 4 et 5 de l'expérience II.

*Expérience III.* — J'ai fait agir à 33° les mélanges suivants :

Eau dist. formolée à 1/2000.	Oléate de méthyle.	Tissu
1	35	2,5
2	70	2,5

et deux mélanges témoins faits dans les mêmes conditions, mais avec des tissus chauffés dans l'eau à 410°. Les nombres du tableau indiquent les proportions, pour 100, d'oléate saponifié.

	1		2	
	Diast.	Tem.	Diast.	Tem.
Après 4 jour .....	»	»	28	»
— 3 jours .....	»	»	46	»
— 8 — .....	42	0	57	»
— 48 — .....	45	0	60	0

L'alcool méthylique récupéré du liquide aqueux représente :

Essai 1.....	2 gr. 4
— 2.....	2 gr. 6

Si nous comparons, en tenant compte des quantités d'eau et d'alcool absorbées ou libérées par les deux phénomènes inverses, ce qu'est devenue au moment de l'équilibre la composition des deux couches juxtaposées qui constituent le mélange en réaction dans les essais 4 et 5 de l'expérience II et dans ceux de l'expérience III, nous voyons qu'elle est la même pour les essais contenant même quantité d'eau, que l'on soit parti du système Alcool + Acide ou du système Eau + Ether.

	Acide libre dans 100 p. couche acide + ether	Alcool en gr. p. 100 gr. d'eau <sup>4</sup> couche eau alcool.
Exp. II. Essai 4.....	45	7.0
— III. — 1.....	45	7.0
Exp. II. Essai 5.....	60	4.9
— III. — 2.....	60	4.8

\* \*

J'ai recherché comment se comporte la diastase pancréatique en présence d'acide oléique et de divers alcools correspondant aux premiers termes de la série grasse. J'ai toujours opéré sur des mélanges équimoléculaires d'acide et d'alcool, avec 1 gramme de tissu pour 20 grammes de mélange, à la température de 33°. Les nombres inscrits dans les colonnes A et B indiquent les proportions pour 100 d'acide éthérifié après 48 heures et après 17 jours. Dans les essais témoins, l'éthérification n'a jamais atteint 100% de l'acide au bout de 17 jours.

	A	B
Alcool méthylque .....	52	79
— éthylique .....	53	83
— propylque .....	67	86
— isopropylque .....	53	74
— butylique normal .....	70	86
— isobutylique .....	2	9
— butylique secondaire .....	61	83
— butylique tertiaire .....	4	4
— isoamylque inactif .....	50	87

L'éthérification se fait bien, marche avec des vitesses comparables et aboutit à des limites sensiblement les mêmes pour

4. Je me suis assuré directement que l'acide oléique ou l'oléate de méthyle n'enlèvent pas d'alcool méthylque à sa solution aqueuse, au moins tant que le taux de celle-ci ne dépasse pas 10 p. 100.

tous les alcools primaires. Pour les alcools secondaires, sur les trois qui ont été essayés (isobutylique, butylique secondaire, fonction alcool secondaire de la glycérine), un seul, l'alcool butylique, n'a pas réagi. L'alcool tertiaire essayé s'est également montré réfractaire.

Sur la façon dont les divers alcools se comportent vis-à-vis de la diastase influent donc à la fois et leur qualité fonctionnelle ( primaire, secondaire, tertiaire) et la constitution des groupements atomiques liés au carbone qui porte l'oxhydrile. Les résultats que j'ai cités suffisent, je crois, pour montrer qu'on peut demander aux phénomènes d'étherification par la lipase pancréatique, en vue de la diagnose ou de la séparation des alcools, des services du même ordre que ceux qu'on demande à l'étherification par la chaleur.

\* \*

L'étude du phénomène d'étherification de la glycérine avec l'acide oléique présente un intérêt spécial à raison du fait que la trioléine constitue avec les composés correspondants des autres acides gras à poids moléculaire élevé, la presque totalité des corps gras naturels : c'est sur elle que s'était tout d'abord porté mon attention.

Lors de mes premiers essais, je faisais réagir l'acide oléique sur le liquide trouble obtenu en filtrant au travers d'un linge une macération de pancréas dans la glycérine ; je reproduis, tel que je l'ai publié en 1903, le résultat auquel j'étais arrivé.

*Expérience IV.* — On a mélangé dans un ballon bien bouché

Extrait glycériné de pancréas.....	100 gr. 23
Acide oléique pur .....	100 gr. 25

et le tout a été mis à l'étuve à 35°. En prélevant à l'origine et à des époques successives un certain poids du mélange, préalablement agité pour le rendre homogène, qui était dissous dans l'alcool à 95° et saturé par la potasse normale en présence de phénolphthaléine, on a suivi les variations de la quantité d'acide restant libre ; cette quantité évaluée eu acide oléique était, pour 10 grammes de mélange :

A l'origine.....	4 gr. 987
Après 2 jours.....	3 gr. 741
— 8 jours .....	3 gr. 315

Au bout de 8 jours la masse a été reprise, elle s'était séparée sous l'action de l'eau chaude en deux couches, l'une inférieure contenant la glycérine, et

l'autre supérieure, renfermant l'acide en excès et l'éther formé. L'acide et l'éther ont été séparés d'après la méthode de Berthelot. On a obtenu de cette façon 26gr.75 d'une huile neutre, légèrement jaunâtre, densité à 20° 0,940,

L'analyse a donné, abstraction faite des cendres,

	Calculé pour la monocléine de la glycérine $C_{21}H_{38}O_4$ .
Trouvé.	—
C.....	70,91
H.....	11,44
O.....	17,65

5gr.248 d'oléine, saponifiés en tube scellé par l'oxyde de plomb, ont donné :

Acide oléique.....	4 gr. 450
Glycérine.....	1 gr. 310

on avait donc affaire à la *monooleine*.

Un mélange témoin, préparé et mis à l'étuve en même temps que le précédent, mais dont l'extrait pancréatique avait été au préalable chauffé pendant 30 minutes à 95°, est resté sans changement, l'acide libre n'a pas varié et le traitement ultérieur de la masse n'a pas fourni d'huile neutre.

Depuis, j'ai fait de nombreuses expériences en employant le tissu pancréatique préparé ; je n'en citerai que quelques-unes : voici d'ailleurs comment elles peuvent être résumées, dans l'ensemble. Lorsqu'on agite un mélange formé de glycérine, d'acide oléique et de poudre pancréatique, on obtient une émulsion qui englobe le tissu et, par le repos, vient nager entre deux couches plus ou moins volumineuses selon la composition du mélange ; l'une, supérieure, d'acide ; l'autre, inférieure, de glycérine. L'émulsion est très stable et quand on veut la défaire, soit dans les prises d'essai, soit à la fin pour isoler l'oléine formée, on éprouve quelque peine ; on y arrive en la chauffant doucement par une immersion de quelques minutes dans l'eau bouillante. Il est à remarquer que cette émulsion se produit à peu près aussi abondante et aussi stable dans les essais témoins dont le tissu pancréatique a été chauffé à 410° sous l'eau, que dans les autres. Quand on opère en présence d'un grand excès de glycérine et qu'on prend soin en outre d'arrêter la réaction assez près du début, l'oléine que l'on sépare donne à la saponification des quantités de glycérine et d'acide qui correspondent exactement à la monooleine. Si la réaction a été prolongée davantage, on trouve toujours, à la sapo-

nification, un excès d'acide oléique, ce qui prouve qu'on a affaire à des oléines à plusieurs molécules d'acide, ou à des mélanges d'oléines qu'aucune méthode analytique ne permet, à l'heure actuelle, de séparer. En reprenant ces mélanges d'oléines et en les traitant par un grand excès d'acide oléique, on arrive à reproduire la trioléine naturelle.

Pour isoler les oléines j'ai employé sans changements la méthode par saturation à la soude et lavages à l'alcool étendu, décrite plus haut.

*Expérience V.* — La monooléine dissoute dans 45 fois son poids d'acide oléique : le mélange additionné de 1/0 de poudre pancréatique et abandonné à l'étuve à 35° a été repris au bout d'un mois. Les dosages successifs d'acidité ayant montré que celle-ci ne variait plus, on a isolé une huile neutre, se solidifiant au voisinage de 0°, densité à 15° 0,945.

14,496 de l'huile ainsi obtenue, saponifiés par l'oxyde de plomb, en tube scellé, ont donné :

Acide oléique.....	43 gr. 890
Glycérine.....	1 gr. 383

ce qui correspond à la *Trioléine*.

Une partie du mélange primitif mise, comme témoin, en contact avec une quantité correspondante de tissu pancréatique préalablement chauffé à 100° sous l'alcool amylique est restée sans changement.

*Expériences VI.* — On a mis à l'étuve à 33° des mélanges renfermant :

N° de l'essai.	Glycérine anhydre desséchée à 110°.	Eau distillée.
1.....	130 grammes	0
2.....	420 —	40 grammes.
3.....	110 —	20 —
4.....	100 —	30 —
5.....	64 —	66 —
6.....	28 —	102 —
7.....	8 —	422 —

et, en outre, chacun 40 grammes d'acide oléique et 3 grammes de poudre pancréatique. Par agitation il se forme dans tous des émulsions volumineuses et stables.

Les essais 2 et 3 ont été faits en double, un témoin étant mis en train dans du tissu traité comme il a été dit pour les témoins de l'expérience II.

Les nombres du tableau ci-dessous indiquent les quantités d'acide étherifié pour 400.

	1	2		3		4	5	6	7
		Diast.	Tém.	Diast.	Tém.				
Après 3 jours.	"	15	"	"	"	"	"	"	"
— 7 —	"	34	"	"	"	"	"	"	"
— 12 —	"	55	"	"	"	"	"	"	"
— 20 —	3	77	0	64	0	51	20	5	0

Les oléines provenant des essais 2, 3, 4, 5, réunies, constituent le mélange A qui a donné à la saponification :

Oléine saponifiée.....	5 gr. 548
Acide oléique.....	4 gr. 957
Glycérine.....	0 gr. 820

L'éthérification se produit encore en présence des solutions de glycérine assez étendues, toutefois l'influence de la dilution se fait sentir plus vite que dans le cas de l'alcool méthylique ; enfin il faut relever cette particularité que le tissu pancréatique, lorsqu'il a été bien déshydraté, ne réagit pas sur le mélange d'acide oléique et de glycérine anhydre, une petite quantité d'eau est nécessaire pour la mise en train de l'éthérification.

Le tissu pancréatique dédouble, en présence d'un excès d'eau, les oléines dont il a déterminé la formation.

*Expérience VII.* — J'ai fait réagir à 33° :

Oléine du mélange A.....	32 gr. 48
Eau formolée à 1/2000 .....	20 gr.
Tissu.....	1 gr. 5

un essai témoin a été fait avec les mêmes proportions relatives des corps réagissants :

	Oléine saponifiée p. %.	
	Diast.	Tem.
Après 3 jours.....	28	"
— 6 jours.....	43	"
— 10 jours.....	62	"
— 15 jours.....	72	"
— 23 jours.....	77	2

du liquide aqueux de l'essai à diastase, j'ai retiré 3gr,05 de glycérine

\* \*

La façon dont se comportent les divers acides vis-à-vis du tissu pancréatique, a été surtout étudiée en présence de l'alcool isoamylque. J'ai employé l'alcool isoamylque pur, du commerce, bouillant à 180°. Il présente pour les expériences que j'ai en vue un double avantage : d'une part, à raison de son point d'ébullition élevé, il se prête bien à la destruction de la diastase par la chaleur dans les essais témoins; d'autre part, un certain nombre d'acides s'éthérifient bien quand ils ne sont mis en présence de l'alcool qu'à doses faibles, mais exercent une action empêchante et même destructive sur la diastase dès qu'on les fait agir à dose un peu élevée; cette action s'exerce moins énergiquement en présence de l'alcool amylique que des autres alcools (méthylique ou éthylique) qu'on peut se procurer commodément.

Pour les essais témoins, le tissu introduit dans l'alcool était chauffé au bain-marie d'eau bouillante pendant 30 minutes, l'acide était ajouté après refroidissement.

*Acide acétique.* — L'éthérification se fait bien tant que l'acide ne dépasse la dose de 40 grammes par litre, au-dessus l'action diastasique se ralentit et s'arrête si la dose par litre atteint 80 grammes.

*Acides butyriques.* — Les deux acides butyrique normal et isobutyrique se comportent de façon très différente; tandis que le premier s'éthérifie bien, même à dose élevée, le second se montre beaucoup moins sensible à l'action diastasique.

*Expérience VIII.* — J'ai fait réagir à 33° les mélanges suivants pour chacun desquels il a été fait un témoin avec du tissu chauffé.

	Alcool amylique	Acide butyr. ou isolbut.	Tissu.
1	—	—	—
2	20	0,5	1
3	20	2	1
		5	1

Les proportions, pour 100, d'acide éthérifié ont été :

	ACIDE BUTYRIQUE						ACIDE ISOBUTYRIQUE					
	1		2		3		1		2		3	
	Diast.	Tém.	Diast.	Tém.	Diast.	Tém.	Diast.	Tém.	Diast.	Tém.	Diast.	Tém.
Après 2 jours.	50	»	50	»	59	»	»	»	8	»	»	»
— 5 —	82	»	85	»	80	»	23	»	45	»	5	»
— 7 —	83	»	87	»	85	»	»	»	25	»	10	»
— 13 —	83	4	87	4	87	4	60	2	59	4	46	2

Si on remplace l'alcool amylique par l'alcool méthylique, l'acide butyrique normal ne s'éthérifie plus qu'à la condition d'être mis en proportion très faible.

*Expérience IX.* — J'ai fait réagir à 33° les mélanges suivants :

	Acide butyrique.	Alcool méthylique	Tissu.
1	0,5	20	4
2	1,0	20	4
3	2,5	20	4

Les proportions centésimales d'acide éthérifié, au bout de 40 jours, ont été :

	DIASTASE	TÉMOIN
Essai 1....	20	4
— 2....	42	4
— 3....	2	4

*Acides lactiques.* — Je n'ai pas observé d'éthérification diastasique appréciable en essayant, même à très faible dose, les acides lactiques droit, gauche et inactif par compensation : ce dernier (acide ordinaire, de fermentation) a seul été essayé à dose élevée, il exerce alors sur la diastase une action empêchante et destructive.

*Expérience X.* — J'ai fait agir à 33° chaque fois 0gr,4 de tissu pancréatique sur 10 c. c. d'un mélange comprenant :

Acide oléique.....	100 grammes.
Alcool amylique.....	31

ces divers essais ont reçu en outre :

	Acide lactique en grammes par litre.
1	0
2	4
3	8
4	48

Les proportions centennales d'acide éthérifié ont été :

	Témoin	1	2	3	4
Après 2 jours.....	7	70	27	»	»
— 6 — .....	10	86	68	42	10

Au bout de 6 jours le tissu des divers essais a été repris, lavé à l'alcool jusqu'à ce que celui-ci n'entraîne plus d'acide et remis en essai dans les mêmes conditions que précédemment, mais sans addition d'acide lactique.

	Acide éthérifié p. % après 12 jours.	
Tissu provenant de l'essai.....	1	82
— — — .....	3	63
— — — .....	4	13

Dans les tissus où l'activité diastasique avait été détruite par le contact prolongé avec la solution d'acide lactique, je n'ai pas pu la faire réapparaître, malgré de nombreuses tentatives par des lavages à l'eau ou à l'alcool légèrement alcalinisés.

*Acide oléique.* — L'acide oléique s'éthérifie bien, ainsi que le montrent les expériences déjà citées. La réaction marche encore si le mélange d'acide et d'alcool se trouve dilué dans une grande quantité d'un liquide indifférent.

*Expérience XI.* — L'essai a été fait avec 1 gr. de tissu pour 20 gr. d'un mélange équimoléculaire d'acide et d'alcool, mais le mélange acide-alcool était dilué dans deux fois son volume de Xylol.

	Acide éthérifié p. %.	
	Témoin.	Diast.
Après 2 jours .....	0	38
— 3 jours.....	0	63

*Acide stéarique.* — L'acide stéarique s'éthérifie quoique un peu lentement. Comme il est peu soluble dans l'alcool amylique, on peut l'ajouter en grand excès, on le voit se dissoudre au fur et à mesure que l'éthérification progresse. Le stéarate d'amyle est un corps neutre blanc, solide à la température ordinaire, fusible à 21°. Il se dissout bien dans l'alcool chaud; mais, par refroidissement, il se sépare en grande partie sous forme de cristaux qui présentent au microscope l'aspect de petites tables carrées. 15gr.501 saponifiés ont donné 12gr.483 d'acide stéarique et 3gr.489 d'alcool amylique.

J'ai essayé avec résultat négatif les acides benzoïque et sulfovinique.

\* \* \*

Je vais, pour terminer, préciser, en quelques points, les conditions dans lesquelles s'exerce ou se détruit la diastase éthérifiante du pancréas.

*Action de la température. Expérience XII.* — J'ai fait agir pendant 24 heures à diverses températures des mélanges comprenant :

Acide oléique .....	40
Alcool méthylique.....	1,14
Tissu.....	0,05

pour les témoins le tissu était traité comme dans le cas de l'*Expérience II*.

	Diast.	Témoin.
A 18° .....	31	0
— 25.....	32	0
— 33.....	33	0
— 40.....	24	1

La région des températures optimales est comprise entre 18 et 35°.

Pour étudier l'action destructive des températures élevées, j'ai fait agir les tissus chauffés pendant 48 heures à 33° dans des milieux ayant la constitution de ceux de l'*expérience II*.

Si le tissu est chauffé sous l'eau, une ébullition de quelques minutes détruit la diastase : 10 minutes est une limite qu'on peut adopter et qui est plus que suffisante; j'ai trouvé plus commode, surtout quand j'avais affaire à de petites quantités de matière,

d'opérer à l'autoclave et, dans ce cas, j'ai chauffé jusqu'à ce que le manomètre indiquât une température de 110°, pour être bien sûr que toutes les portions de tissu seraient portées au moins à 100°.

Si la poudre pancréatique est chauffée au bain-marie à 100° dans l'alcool anylique, la destruction de la diastase est un peu moins rapide et il est nécessaire de chauffer pendant 30 minutes.

*Influence des quantités de diastase.* — La quantité de tissu mise en œuvre influe sur la vitesse de l'éthérification, mais non pas sur les conditions de l'équilibre limite.

*Expérience XIII.* — J'ai fait agir à 33° sur poids égaux d'un mélange équimoléculaire d'acide oléique et d'alcool méthylique des quantités variables de tissu.

POIDS DE TISSU pour 100 gr. de mélange.	ACIDE ÉTHÉRIFIÉ POUR 100		
	Après 1 jour.	Après 3 jours.	Après 20 jours.
1	8	56	84
2	12	66	82
5	27	66	84
10	43	74	85

*La diastase n'entre pas en solution dans le milieu qui s'éthérifie.*

*Expérience XIV.* — Un essai a été mis en train à 33° avec 40 grammes d'un mélange équimoléculaire d'acide et d'alcool méthylique ; au bout de 48 heures, 40 p. 100 de l'acide étant éthérifié, j'ai réparé par filtration tout le liquide qui a été divisé en deux parties, l'une A est remise sur le tissu, l'autre B est placée dans un tube à part, les deux sont remises côte à côte à l'étuve.

	PROPORTION D'ACIDE ÉTHÉRIFIÉ POUR 100 depuis l'origine.	
	A	B
1 jour après remise à l'étuve.....	60	40
3 jours — — —	78	40
8 — — —	83	40

Le fait qu'une action diastasique s'exerce sans que le ferment

entre en solution est d'observation banale. Il se produit avec toutes les diastases qui ne diffusent pas au travers des parois cellulaires, mais qu'on peut faire agir en employant les cellules elles-mêmes tuées. Dans le cas particulier de la poudre pancréatique, l'examen microscopique montre qu'elle contient, surtout si on a broyé l'organe préalablement haché avec du sable fin, une grande quantité de débris cellulaires et de cellules dilacérées ; il est donc certain que la diastase éthérifiante n'est pas simplement séparée du milieu par une membrane imperméable, mais qu'elle reste fixée sur l'élément cellulaire auquel appartient la propriété spécifique, bien que celui-ci ait été mis en liberté. M. Nieloux a constaté un fait du même ordre avec la lipase des graines de Ricin<sup>1</sup>.

1. NIELOUX, *Académie des Sciences*, 30 mai 1904.

---

# La spirillose des embryons de poulet

dans ses rapports avec la Tréponémose héréditaire de l'homme

PAR C. LEVADITI

---

Bientôt après la découverte du *Treponema pallidum* (Schaudinn et Hoffmann) dans les manifestations primaires et secondaires de la syphilis acquise, les recherches de Buschke et Fischer et de Levaditi ont montré l'existence de ce parasite dans les altérations cutanées et viscérales de l'héredo-syphilis. Grâce à l'emploi de la méthode à l'argent combiné à l'acide pyrogallique, méthode dérivée de celle de Bertarelli, Volpino et Bovero, nous avons complété récemment ces premières recherches et, en collaboration avec Salmon et Sauvage, nous avons déterminé les rapports qui existent entre les tréponèmes, d'une part, et les lésions que l'on constate chez les héredo-syphilitiques, d'autre part<sup>1</sup>. Nos constatations ont ainsi prouvé que la syphilis héréditaire est, en dernière analyse, une spirillose aiguë, ou relativement chronique des nouveau-nés issus de parents syphilitiques. En effet, si, par certains côtés, la tréponémose des rejetons héredo-syphilitiques s'écarte sensiblement des spirilloses humaines et animales connues, par contre, nombreuses sont les ressemblances qu'une analyse attentive permet de révéler entre ces deux ordres de processus.

Ces considérations montrent suffisamment l'intérêt des recherches ayant pour but l'étude expérimentale de l'infection spirillienne des embryons. Ces recherches peuvent nous renseigner sur les conditions qui président à la transmission héréditaire des spirilloses et apporter quelques contributions au chapitre de la tératologie expérimentale; en outre, elles peuvent préciser davantage les rapports qui existent entre la tréponémose héréditaire de l'homme et ces spirilloses.

En mai 1905, M. Borrel a, le premier, réussi à infecter les embryons de poulet avec le spirille découvert au Brésil par Marhoux et Salimbeni. En introduisant dans l'œuf fécondé une

<sup>1</sup>. Voir ces *Annales*, janvier 1906, vol. XX, p. 41.

certaine quantité de sang de poule riche en spirilles, ce savant a obtenu des poussins présentant une septicémie spirillienne des plus accentuée. En poursuivant ces recherches, Borrel a vu qu'il est possible de transmettre la spirillose aux embryons de poulet, même lorsqu'on pratique l'injection de virus dans l'œuf au début de l'incubation.

Ayant eu l'occasion de répéter ces expériences, nous avons confirmé ces données et nous avons recueilli quelques faits nouveaux qui complètent l'étude de la spirillose embryonnaire, telle qu'elle avait été commencée par Borrel. Ces faits font le sujet du présent mémoire divisé en deux parties : la première a trait à *l'étude expérimentale et anatomo-pathologique de l'infection spirillienne des embryons de poulet*, la seconde concerne *l'hérédité dans la septicémie brésilienne*.

## I

## SPIRILLOSE DES EMBRYONS DE POULET

Le procédé que nous avons employé pour donner la spirillose aux embryons de poulet est le suivant : A l'aide d'une pipette effilée, on introduit quelques gouttes de sang contenant des spirilles dans le blanc d'un certain nombre d'œufs fécondés. La coque de ces œufs a été préalablement perforée sur l'orifice (de préférence du côté opposé à la chambre d'air), au moyen d'une aiguille portée au rouge. Après l'injection, on laisse tomber une goutte de cire à cacheter et on place les œufs dans la couveuse<sup>1</sup>.

Conformément aux constatations antérieures de Borrel, nous avons vu, dans une première série d'expériences, que *les spirilles injectés dans l'œuf ne restent vivants et ne se multiplient que lorsque cet œuf est fécondé et qu'il donne lieu à la formation d'un embryon*. Tous les essais de culture des spirilles dans les œufs non fécondés sont, en effet, restés infructueux. Par contre, dès qu'il y a formation d'une ébauche d'aire vasculaire, on peut être certain que l'introduction du virus sera suivie d'une infection spirillienne de l'embryon et des vaisseaux qui entrent dans la constitution de cette aire. Ce fait est particulièrement intéressant. Il montre que l'albumine et le vitellus, tels qu'ils sont contenus dans l'œuf avant sa germination, constituent un mauvais élément nutritif pour les spirilles. Ceux-ci semblent ne pouvoir assimiler les matériaux de l'œuf que si l'embryon, par l'intermédiaire de ses

1. Nous nous sommes servi d'une couveuse appellée la *Houdanaise*, réglée au voisinage de 40°.

cellules, a déjà fait subir certains changements à ces matériaux. *La présence d'éléments cellulaires vivants est donc une condition indispensable pour la culture des microorganismes spirillés dans l'œuf.*

De plus, nous avons constaté que l'apparition de l'infection spirillienne chez l'embryon de poulet dépend du moment où l'on pratique l'inoculation du virus. Elle manque toutes les fois que cette inoculation est faite un jour ou deux avant le commencement de l'incubation, et n'a lieu que rarement lorsqu'on injecte les œufs le premier ou le second jour de cette incubation. Ceci tient à deux causes : tout d'abord, à la dégénérescence et à la mort rapide des spirilles introduits dans l'œuf avant la segmentation, ce qui fait que la virulence de ces spirilles est fortement affaiblie ou complètement anéantie au moment où cette segmentation commence. Ensuite, à l'influence empêchante que toute injection faite dans l'œuf au début de l'incubation, exerce sur le développement ultérieur de l'embryon.

Mais si l'on a soin d'inoculer le virus le 3<sup>e</sup> ou le 4<sup>e</sup> jour de l'incubation, on obtient facilement une spirillose des embryons de poulet. Cette spirillose, caractérisée par la présence de nombreux parasites, non seulement dans les organes et le système vasculaire de l'embryon, mais aussi dans les vaisseaux de la circulation vitelline et allantoïdale (aire vasculaire), débute le premier ou le second jour qui succède à l'inoculation. Elle dure 6, 7, 8 jours ou plus et est suivie de la mort de l'embryon dans l'œuf. En général, cette mort est d'autant plus précoce que l'injection de sang virulent a été faite plus près du début de l'incubation, ce qui revient à dire que la maladie évolue plus rapidement chez les embryons très jeunes.

Ajoutons que, contrairement à ce que l'on constate chez les poules adultes atteintes de la septicémie brésilienne, *jamais la spirillose des embryons de poulet n'est suivie d'une guérison précédée par la crise qui, chez les animaux adultes, préside à la disparition des spirilles de la circulation générale.*

\* \*

Nous avons essayé de préciser le sort des spirilles injectés dans les œufs fécondés et rechercher la voie suivie par ces spirilles pour pénétrer dans l'organisme des embryons de poulet.

Pour ce qui concerne le premier point, nous avons constaté que les parasites introduits dans l'albumen ne tardent pas à s'immobiliser et à montrer des signes de dégénérescence, se traduisant par la formation de granulations et par l'apparition de spirilles en grain de chapelet. Peu de temps après leur introduction dans le blanc d'oeuf, un grand nombre de ces spirilles s'enroulent sur eux-mêmes pour former des nœuds irréguliers, ou des boucles (Pl. XXXIII, fig. 8, *s*)<sup>1</sup>; d'autres spirilles montrent des formes d'involution, se caractérisant par la présence de corpuscules métachromatiques en plein corps du parasite (*faux noyaux*). Lorsque l'injection de sang riche en spirilles a été faite dans le vitellus, on constate que ces spirilles s'accroissent aux grains vitellins, qu'ils entourent parfois complètement (Pl. XXXIII, fig. 8, *s*). Ces changements morphologiques des parasites montrent qu'aucune culture des spirilles ne s'opère dans ces conditions et que la multiplication de ces spirilles ne s'effectue qu'au contact des cellules de l'embryon.

Pour ce qui a trait à la voie suivie par les spirilles pour envahir l'organisme embryonnaire, nos recherches ont montré que cette voie est celle de la circulation de l'aire vasculaire. En effet, si l'on a soin d'ouvrir les œufs peu de temps après l'injection du virus, on remarque que le sang des vaisseaux formant le réseau du système ombilical est sensiblement plus riche en parasites que le liquide hématique puisé dans le cœur de l'embryon.

*Il s'ensuit que le foie de l'embryon est l'organe qui, par l'intermédiaire de cette circulation ombilicale, reçoit le premier les germes virulents.* De fait, dans plus d'un cas, l'examen des frottis et des coupes (v. plus loin) nous a montré que la richesse en spirilles de la glande hépatique dépasse de beaucoup celle des autres viscères (poumon, rate, rein, etc.). De plus, toutes les fois que l'examen macroscopique des embryons nous a révélé la présence

1. Ces spirilles disposés en boucle ou formant des nœuds rappellent ceux que nous avons rencontrés sur les frottis de rate provenant de poules sacrifiées en pleine crise. (Voir ces *Annales*, vol. 18, mars 1904, p. 429.)

Il s'agissait alors de parasites phagocytés par les macrophages de la rate et que l'écrasement mécanique de ces macrophages avait mis en liberté. L'existence de formes identiques dans le blanc ou le jaune d'oeuf montre que cet enroulement des spirilles sur eux-mêmes, phénomène qui traduit un état de souffrance des parasites, peut s'opérer aussi en absence de tout élément cellulaire. En tout cas, rien ne nous autorise à considérer ces formes particulières comme représentant un stade de repos, ainsi que le veut Prowazek (*Arb. aus. dem Kaiser. Gesundheitsamte*, vol. XXIII, 1906).

de lésions, ces lésions ont été plus étendues et plus graves dans le foie qu'ailleurs.

\* \* \*

Les altérations déterminées par l'infection spirillienne des embryons de poulet peuvent être réparties en deux catégories : celles que l'on constate chez les embryons sacrifiés en pleine septicémie spirillienne, ou ayant succombé depuis peu, et celles que l'on décèle chez les embryons morts dans l'œuf depuis un certain temps déjà et qui ont subi une macération plus ou moins intense (*embryons macérés*).

a) Les lésions constatées chez les embryons sacrifiés peu avant la mort, intéressent surtout le *foie*. Elles sont d'ordre inflammatoire, dégénératif ou hémorragique, comme il ressort des constatations suivantes :

*Expérience 5, embryon c.* — L'injection a été pratiquée le 5<sup>e</sup> jour de l'incubation ; l'œuf a été ouvert huit jours après l'inoculation. L'embryon est vivant et mesure environ 5 centimètres. Le foie est hypertrophié, de couleur jaune ; il montre, sur la plus grande partie de sa surface, des plaques verdâtres, entourées d'une liséré hémorragique.

L'examen histologique révèle la présence d'un large foyer de nécrose intéressant le bord libre du foie, foyer limité par une zone hémorragique assez accentuée. Le protoplasma des éléments hépatiques est en grande partie coagulé, le noyau est hyperchromatique, en état de picnose. Les cellules sont dissociées par des globules rouges dont le noyau est très avide de couleurs basiques (Pl. XXXIV, fig. 7).

*Expérience 9, embryon a.* — L'injection a été faite dix jours après le début de l'incubation ; l'œuf a été ouvert six jours après l'infection. L'embryon vivant mesure environ 6 centimètres. Le foie est de couleur jaune verdâtre ; il montre des foyers grisâtres de nécrose et des hémorragies punctiformes.

L'examen histologique fait à l'aide de la méthode à l'argent, montre que les éléments hépatiques sont en grande partie atteints de dégénérescence graisseuse, surtout ceux situés à la limite des foyers de nécrose. Ces foyers intéressent le bord libre de l'organe ; à leur niveau, on ne rencontre que des vestiges de cellules hépatiques emprisonnées par une multitude de leucocytes mononucléaires et par quelques rares polynucléaires (Pl. XXXIV, fig. 2).

Les spirilles, en assez grand nombre, sont disposés entre les cellules du foie, isolés ou par faisceaux ; ils sont plus rares au niveau des foyers de nécrose et d'inflammation dont nous venons de parler.

La gravité des lésions hépatiques contraste avec la faible intensité des altérations constatées dans les autres organes (la rate, p. ex.). Les modifications du *sang* seules méritent d'être

enregistrées, étant donnée l'analogie qu'elles offrent avec les lésions hématiques décrites chez certains hérédo-syphilitiques. Il s'agit de la persistance du caractère myéloïde ou plutôt embryonnaire des éléments figurés du sang, chez les embryons sacrifiés un ou deux jours avant leur éclosion. Normalement, vers la fin de l'incubation, le sang de ces embryons perd l'aspect myéloïde qu'il présentait auparavant, pour devenir ce qu'il sera plus tard chez le petit poussin. Par contre, chez les embryons infectés par le spirille de Marchoux et Salimbeni, on constate que les globules blanches et les hématies gardent plus longtemps cet aspect myéloïde. On remarque, en effet, la présence d'un grand nombre de myélocytes granulés (Pl. XXXIII, fig. 5, m), de leucocytes mononucléaires vacuolisés, et de globules rouges à protoplasma basophile (*e'*) et à noyau en division caryokinétique. De plus, il n'est pas rare de découvrir, dans le sang de ces embryons, des signes d'hémolyse, se traduisant par l'existence de nombreuses hématies réduites à l'état de stroma (fig. 5, e).

Devant ces constatations, on est tenté de faire un rapprochement entre les altérations hématiques provoquées par le *Spirillum gallinarum* chez les embryons de poulet, d'une part, et les modifications sanguines que l'on a rencontrées chez les rejetons issus de parents syphilitiques, d'autre part. Sans entrer ici dans les détails de l'hématologie de l'hérédo-syphilis, nous rappellerons seulement que, dans la tréponémose héréditaire de l'homme, le sang acquiert souvent des caractères myéloïdes, se manifestant par la présence soit de myélocytes granulés, soit d'hématies nucléées (*normoblastes*).

*Embryons macérés.* — Lorsque, à la suite de la septicémie brésilienne, l'embryon de poulet déjà formé meurt à l'intérieur de l'œuf, et si l'on a soin d'ouvrir cet œuf un certain temps après la mort de l'embryon, on constate que cet embryon a subi des transformations qui le rapprochent sensiblement des fœtus macérés hérédo-syphilitiques. On se trouve en présence d'un embryon ratatiné, flasque, parfois desséché, et dont la peau se détache par lambeaux; d'autre part, les organes sont devenus presque incolores, friables et le sang a subi une hémolyse complète. Voici d'ailleurs la description détaillée de quelques-uns des embryons macérés observés par nous :

*Expérience 7, embryon e.* — (Pl. XXXIII, fig. 2.) L'injection de virus a été faite le 4<sup>e</sup> jour de l'incubation, l'œuf a été ouvert huit jours après l'injection. L'embryon mort et macéré mesure environ 6 centimètres. Foie gras, jaunâtre, friable; rate de couleur blanchâtre, également friable, presque desséchée; sang du cœur complètement hémolysé. Les frottis montrent la présence de nombreux spirilles dans le sang du cœur, dans le foie et la rate; les cellules de ces organes ont été complètement détruites par le processus de macération.

L'examen histologique du foie permet de constater que les éléments hépatiques possèdent un noyau pâle, fragmenté, et un protoplasma granuleux, déchiqueté, offrant peu d'affinité pour les matières colorantes. Ces éléments sont dissociés par une grande quantité de globules rouges; ces derniers ont perdu leur hémoglobine et sont réduits à l'état de stroma, pourvu de noyaux pâles (Pl. XXXIV, fig. 1). Le foie renferme un grand nombre de spirilles. La plupart de ces spirilles continuent à bien s'imprégner par l'argent; ils sont situés entre les cellules hépatiques et semblent parfois pénétrer dans le protoplasma même de ces cellules. On rencontre également des spirilles agglutinés, disposés par faisceaux, et des parasites dégénérés ayant pris l'aspect moniliforme. Certains spirilles se sont infiltrés dans la paroi des vaisseaux hépatiques (Pl. XXXIV, fig. 1, v<sup>o</sup>).

Les coupes de *rein* montrent la présence d'une macération prononcée des cellules rénales. Les spirilles, assez nombreux, pénètrent à l'intérieur des tubes du rein; on les rencontre disposés longitudinalement entre les épithéliums des tubuli, ou libres, dans le contenu granuleux des canaux contournés (Pl. XXXIV, fig. 5). Quelques parasites circulent dans le réseau capillaire des glomérules.

Nous avons fait des constatations analogues chez l'embryon *d* de l'expérience 7 (inoculé le 4<sup>e</sup> jour de l'incubation, œuf ouvert 7 jours après l'infection) et chez l'embryon *f* de l'expérience 4 (Pl. XXXIV, fig. 3); injection du virus le deuxième jour de l'incubation, ouverture de l'œuf 14 jours après l'inoculation.

\* \* \*

L'examen des frottis et des coupes provenant d'embryons sacrifiés au cours de la septicémie spirillienne nous a montré fréquemment l'existence d'une *phagocytose* des spirilles, réalisée par les leucocytes du sang et surtout par les macrophages du foie, de la rate et du rein. Les leucocytes polynucléaires englobent rarement les éléments spirilliens (Pl. XXXIII, fig. 11, ff cellule de gauche); par contre, dans le foie, les cellules de Kupffer sont parfois farcies de spirilles. Quelquefois ces derniers conservent leur forme filamentuse et ondulée; mais le plus souvent les parasites intra-cellulaires, logés dans des vacuoles protoplasmiques, s'enroulent sur eux-mêmes et finissent par former des anneaux irréguliers, destinés à se trans-

former en granulations colorables en noir par l'argent (Pl. XXXIII, fig. 12 cellule de droite, *s*; Pl. XXXIV, fig. 6, *m*).

Le même phénomène s'observe dans la rate et le rein. Dans ce dernier organe, la phagocytose est réalisée soit par les leucocytes mononucléaires intra-vasculaires (Pl. XXXIV, fig. 4, *m*), soit par les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires glomérulaires. (Pl. XXXIV, fig. 3, *e*.)

\* \* \*

Les faits exposés dans ce chapitre permettent de formuler un certain nombre de conclusions ayant trait aux rapports que l'on peut établir entre la spirillose des embryons de poulet et la tréponémosis des rejetons hérédo-syphilitiques. Les voici :

Comparée à la septicémie spirillienne des poulets adultes, la spirillose des embryons nous apparaît comme étant infiniment plus grave; les lésions qu'elle provoque sont en effet incomparablement plus profondes que celles que l'on rencontre chez les poules atteintes de la septicémie brésilienne<sup>4</sup> et, d'autre part, contrairement à ce qui se passe chez ces animaux adultes, *la spirillose des embryons ne semble pas se terminer par une disparition critique des spirilles de la circulation générale*. Cette gravité particulière de la maladie spirillienne ne doit pas surprendre. Il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'une infection microbienne évoluant chez des êtres qui n'ont accompli qu'une partie de leur vie embryonnaire et qui, de par ce fait même, possèdent des moyens de défense encore imparfaits. A ce point de vue il y a une analogie frappante entre la spirillose embryonnaire et la syphilis héréditaire, laquelle, cliniquement et anatomo-pathologiquement parlant, est incomparablement plus grave que l'infection syphilitique de l'homme adulte. On n'a qu'à comparer la richesse en tréponèmes des divers organes prélevés chez des hérédo-syphilitiques, ainsi que les altérations étendues de ces organes, avec le petit nombre de spirochètes que l'on a décelés dans les viscères des syphilitiques adultes<sup>2</sup>, pour se pénétrer de la réalité de cette susceptibilité particulière des êtres incomplètement développés, vis-à-vis des infections spirillliennes.

4. Voir à ce sujet : Levaditi et Manouélian, ces *Annales*, vol. 20, juillet 1906, p. 593.

2. JACQUET et SÉZARY ont décelé les tréponèmes exclusivement dans les capsules surrenales, chez un syphilitique adulte (Soc. médicale des Hôpitaux, 23 mars 1906).

En dehors de ces caractères concernant la gravité de la spirillose embryonnaire, l'étude anatomo-pathologique de cette maladie nous permet d'établir des ressemblances, mais aussi des différences entre cette spirillose et l'hérédo-syphilis.

Dans nos recherches sur la tréponémose héréditaire de l'homme<sup>1</sup>, nous avons montré que cette affection spirillienne diffère des autres septicémies à spirilles (spirillose des poules, fièvre récurrente de l'homme) par le fait que le *Treponema pallidum* n'est pas un parasite du sang, comme c'est le cas des autres spirilles bien connus. Le liquide hématique des nouveau-nés hérédo-syphilitiques ne renferme, en effet, que relativement peu de tréponèmes, ceux-ci étant surtout répandus dans les divers parenchymes glandulaires. Or, chez les embryons de poulet, le *Spirillum gallinarum*, continuant à se comporter comme chez les animaux adultes, pullule abondamment dans le sang de la circulation générale et la maladie qu'il provoque est bien une vraie septicémie (Pl. XXXIII, fig. 3). Il y a donc, à ce point de vue, une dissemblance entre ce processus et l'hérédo-syphilis.

Un autre caractère différentiel est fourni par l'examen des altérations histologiques que nous avons rencontrées chez nos embryons infectés. On sait que les lésions de l'hérédo-syphilis sont surtout caractérisées par l'existence de foyers d'inflammation mononucléaire, répandus soit en plein tissu interstitiel, soit autour des vaisseaux, foyers qui, principalement dans le foie, sont destinés à se transformer en une sclérose plus ou moins diffuse. Chez les embryons de poulet atteints de spirillose, les altérations viscérales, en particulier celles de la glande hépatique, n'offrent que rarement ce caractère inflammatoire interstitiel et périvasculaire. Point de nodules à mononucléaires, ni de sclérose dans ces altérations, qui sont essentiellement de nature dégénérative et hémorragique. Encore une dissemblance entre la syphilis héréditaire et la spirillose qui fait le sujet de notre étude.

Les analogies entre les deux processus sont multiples. Il y a tout d'abord la gravité des lésions du foie, organe qui, chez le fœtus humain comme chez l'embryon de poulet, est le premier à recevoir le virus par l'intermédiaire de la circulation ombi-

1. LEVADITI, Ces *Annales*, vol. XX, janvier 1906, page 41.

licale. Ensuite, un rapprochement s'impose entre le caractère dégénératif et hémorragique de certaines lésions constatées chez les rejetons hérédo-syphilitiques et les dégénérescences parenchymateuses et les hémorragies que nous avons rencontrées chez nos embryons. Dans nos études sur la syphilis héréditaire, nous avons montré que le tréponème ne s'attaque pas seulement au système conjonctif et vasculaire, mais qu'il provoque aussi des lésions dégénératives des éléments glandulaires, dans le protoplasma desquels il réussit parfois à pénétrer (cellules hépatiques, cellules des capsules surrenales ou des glandes sudoripares, par exemple). Or, à peu de chose près, le *Spirillum gallinarum* se comporte, à ce point de vue, comme le *Treponema pallidum*. — Il s'infiltre parmi les cellules du foie et du rein, entre en contact intime avec le corps protoplasmique de ces cellules<sup>1</sup> et finit par déterminer la dégénérescence et la nécrose plus ou moins complète de ces éléments. Comme les tréponèmes dans la syphilis héréditaire d'ailleurs, le spirille de Marchoux et Salimbeni provoque, chez les embryons, des hémorragies plus ou moins étendues, hémorragies qui peuvent atteindre le système cutané et réaliser un type hémorragique de la spirillose embryonnaire, à rapprocher des formes analogues de l'hérédo-syphilis. (Planche XXXIII, fig. 1.)

Mais ce qui permet le plus d'établir un trait d'union entre cette hérédo-syphilis et la spirillose des embryons de poulet, c'est le processus de macérations qui imprime aux embryons morts dans l'œuf, des modifications rappelant celles que l'on a décrit chez les fœtus macérés issus de parents syphilitiques. La ressemblance est ici des plus frappantes. D'un côté comme de l'autre, on a affaire à des embryons (ou des fœtus) ratatinés, ramollis, parfois presque desséchés, et dont le revêtement cutané se détache par lambeaux. Les viscères de nos embryons macérés, comme ceux des macérés syphilitiques, sont décolorés ou rougeâtres, friables, flasques; le sang est plus ou moins complètement hémolysé.

L'histologie ne fait d'ailleurs que confirmer ces ressemblances

1. Comme on peut s'assurer en examinant les figures 1 et 2 de la Pl. XXIV, le *Spirillum gallinarum* envahit réellement le corps protoplasmique des cellules du foie des embryons macérés ou sacrifiés en pleine infection; néanmoins ce phénomène ne se rencontre que rarement.

macroscopiques. Les frottis colorés au Giemsa montrent que les cellules du foie ou de la rate sont plus ou moins détruites par le processus de macération et que les spirilles, malgré cette destruction des éléments anatomiques, conservent leur forme et leurs affinités colorantes (Pl. XXXIII, figures 6 et 7). Les coupes permettent d'analyser de plus près cette macération des cellules et la méthode à l'argent met en évidence des spirilles en grand nombre, répandus parmi ces cellules macérées. Ce sont là des constatations analogues à celles que Bronnum et Ellermann<sup>1</sup>, à l'aide des frottis, Queyrat, Levaditi et Feuilliée<sup>2</sup>, au moyen des coupes, ont fait chez les rejetons hérédo-syphilitiques macérés.

Quant au mécanisme de ce processus de macération, il nous apparaît comme étant des plus simples. Il s'agit, pour nous, d'une autodigestion des tissus embryonnaires réalisée par les ferments protéolytiques existant dans l'œuf, ferments qui doivent provenir, du moins en partie, de l'embryon lui-même. En tout cas, les spirilles n'interviennent nullement d'une façon directe dans la naissance de ce processus de macération. Ce qui le prouve, c'est le fait que des altérations analogues à celles que nous avons constatées chez nos embryons infectés et macérés, se rencontrent également chez les embryons qui succombent dans l'œuf, à la suite de causes autres que l'infection spirillienne. D'ailleurs, l'autodigestion qui aboutit à la macération plus ou moins intense des tissus, ne s'exerce pas d'une façon égale vis-à-vis des divers constituants de l'œuf fécondé. Nous avons remarqué dans nos expériences, que la macération accentuée des tissus embryonnaires et l'hémolyse du sang du cœur peuvent coexister avec un état de conservation relative de l'aire vasculaire et des hématies qui circulent dans les vaisseaux de cette aire. Ce fait semble plaider en faveur de l'origine embryonnaire (ou fœtale) des ferments autodigestifs, cause de la macération. Inutile d'insister ici sur le rapprochement qu'il y a lieu d'établir entre ces constatations et celles qui se rattachent à l'étude anatomo-pathologique et microbiologique du fœtus hérédo-syphilétique macéré; notre récent travail, ayant trait à cette dernière question, renferme des données qui permettent de considérer

1. BRONNUM et ELLERMANN, *Deutsche med. Woch.*, n° 44, 1905.

2. QUEYRAT, LEVADITI et FEUILLIÉE, *Société de Dermatologie*, décembre 1905.

la macération de rejetons issus de parents syphilitiques, comme étant un processus identique à celui que nous venons de décrire chez les embryons spirillés.

Remarquable est la résistance que les tréponèmes de Schaudinn et Hoffmann de même que le *Spirillum gallinarum* opposent à l'action détériorante des agents fermentatifs qui provoquent la macération. Sans être trop affirmatif à ce sujet, nous sommes enclins à admettre l'existence d'une enveloppe protoplasmique résistante chez ces spirilles, enveloppe dont la composition doit différer sensiblement de celle du protoplasma des éléments cellulaires qui entrent dans la constitution des divers parenchymes. Ceci pourrait expliquer la présence de parasites ayant conservé leur forme et leurs affinités colorantes dans des tissus macérés dont les cellules sont, pour la plupart, profondément altérées, ou presque complètement détruites.

Un mot, pour finir, à propos de la *phagocytose* des spirilles et l'absence de crise que nous avons constatées chez nos embryons infectés. La disparition critique des spirilles chez les poules adultes qui guérissent de la maladie est, d'après nos recherches antérieures et celles plus récentes, faites en collaboration avec Manouélian, le résultat de la phagocytose de ces spirilles réalisée par les macrophages du foie et de la rate. Or, de prime abord, il semble contradictoire de trouver, chez certains embryons de poulet, une phagocytose intense de ces spirilles coexistant avec l'absence de guérison et de crise. Mais ce n'est là qu'une contradiction apparente. On sait, en effet, que malgré la disparition critique des spirilles et la phagocytose qui en est la cause, certains poulets adultes peuvent mourir d'amalgrissement quelque temps après la fin de la septicémie. Cette mort est due à l'intervention des toxines que, fort vraisemblablement, les spirilles sécrètent dans l'organisme au cours de l'infection et qu'ils peuvent mettre en liberté après leur mort dans le protoplasma des phagocytes. Il est donc très probable que chez les embryons de poulet, organismes d'une sensibilité extrême à l'égard des toxines, lempoisonnement et la mort très précoces arrivent avant même que tous les spirilles soient englobés et digérés par les leucocytes. De là l'existence d'une phagocytose plus ou moins prononcée chez des animaux qui ne

réalisent jamais la disparition critique des spirilles de la circulation et des organes.

## II

### L'HÉRÉDITÉ DANS LA SPIRILLOSE DES POULES

Dans nos recherches concernant la transmission héréditaire de la spirillose brésilienne, nous ne nous sommes pas occupé de l'influence exercée par le coq dans cette transmission ; nous avons envisagé exclusivement les propriétés des embryons issus de poules préalablement infectées par le spirille de Marchoux et Salimbeni. Afin de préciser si : 1<sup>o</sup> *l'infection spirillienne du génératrice femelle se transmet aux rejetons, et si 2<sup>o</sup> ces rejetons acquièrent ou non une immunité vis-à-vis de la septicémie à spirille*, nous avons procédé de la façon suivante :

Une poule bonne pondeuse, mise fréquemment en contact avec le coq, est infectée par injection sous-cutanée le 21 juillet 1903 ; l'infection atteint son maximum le 24 et la crise apparaît le 25 juillet.

Cette poule qui, jusqu'au début de la septicémie, pondait chaque jour, a cessé de pondre à partir de ce moment : *ce n'est que du 12 au 15 août, c'est à dire 22 jours après l'injection du virus et 48 jours après la guérison, que l'animal a pondu une série de 4 œufs*. Trois de ces œufs, qui se sont montrés tous fécondés, ont été soumis à l'expérimentation.

*Œuf I*, reçoit une injection de virus le 6<sup>e</sup> jour de l'incubation, en même temps qu'un œuf témoin. On l'ouvre 5 jours après l'injection. L'embryon vivant est parfaitement développé et ne renferme pas des pirilles. L'embryon témoin montre une infection spirillienne intense.

*Œuf II*, reçoit une injection de virus le 45<sup>e</sup> jour de l'incubation. Il est ouvert 4 jours après l'inoculation. L'embryon vivant et bien développé est indemne de toute infection. Le témoin est farci de spirilles.

*Œuf III, non infecté*, est ouvert le 8<sup>e</sup> jour de l'incubation.

Il renferme un embryon mort et macéré, *mais non infecté*.

Cette expérience montre que .

1<sup>o</sup> *La spirillose brésilienne n'est pas transmissible héréditairement aux embryons issus de poules infectées* ;

2<sup>o</sup> *Ces embryons sont immunisés vis-à-vis de l'infection par le Spirillum gallinarum*.

Ces constatations méritent d'être examinées de plus près. L'absence de transmission héréditaire de la spirillose des poules surprend, lorsqu'on pense que la tréponérose syphilitique est éminemment transmissible de la mère à l'enfant et, surtout lorsqu'on se rappelle que nos recherches faites en collaboration avec

Manouélian, ont prouvé la pénétration du *Spirillum gallinarum* dans l'orule. Le phénomène est d'ailleurs difficile à expliquer. En tout cas, il faut se demander si cette absence de transmissibilité héréditaire de la septicémie spirillienne, n'est pas due au fait que les œufs infectés par les spirilles, ne sont plus capables d'être fécondés ou de se segmenter. Il est également possible que les spirilles intra-ovulaires meurent pendant le long espace de temps qui s'écoule entre la ponte ovarienne et l'expulsion et la segmentation de l'œuf, cela d'autant plus que nos recherches ont montré la courte vitalité des spirilles injectés dans les œufs non fécondés.

Quant à l'immunité des embryons issus de poules guéries de la septicémie spirillienne, elle est très vraisemblablement passive, conformément à tout ce que l'on sait de la transmission héréditaire de l'immunité (Ehrlich, Behring, etc.). Il s'agit d'une absorption de la part de l'œuf fécondé, des anticorps existant en grande quantité dans le sang des poules qui ont fait leur crise<sup>1</sup>, absorption qui doit s'opérer soit dans l'ovaire, soit et surtout pendant le trajet qu'accomplit l'œuf dans l'oviducte. On sait en effet, à la suite des expériences de F. Klemperer<sup>2</sup> et de Metchnikoff<sup>3</sup>, que les toxines et les antitoxines, en particulier l'antitoxine tétanique, passent facilement dans l'œuf. D'ailleurs nous avons eu soin d'apporter une preuve directe en faveur de cette hypothèse. Nous avons ajouté, à du sang contenant des spirilles, une émulsion de blanc et de jaune provenant d'un œuf pondu par notre poule guérie de la septicémie spirillienne; ces spirilles, surtout ceux qui ont été mis en contact avec le jaune, se sont rapidement immobilisés.

1. Le sérum de la poule qui nous a servi à ces expériences agglutinait et immobilisait les spirilles.

2. F. KLEMPERER, *Arch. für exp. Pathol.* 1893, T XXI, p. 371.

3. METCHNIKOFF, *L'immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, 1901.

### LÉGENDES DES PLANCHES

**Pl. XXXIII.** — *Fig. 1. — Hémorragies cutanées chez un embryon de poulet atteint d'infection spirillienne.*

*Fig. 2. — Embryon macéré.*

*Fig. 3. — Embryon macéré.*

*Fig. 4. — Embryon macéré.*

*Fig. 5. — Frottis de sang d'un embryon de 18 jours, infecté le 10<sup>e</sup> jour de l'incubation. Coloration au Giemsa.*

*e*, hématie normale; *e'*, hématies ayant perdu leur hémoglobine et dont le stroma est ratatiné; *e''*, hématie basophile; *p*, polynucléaire granulé; *m*, mononucléaires granulés; *s*, spirilles.

*Fig. 6. — Frottis de foie d'un embryon macéré. c, débris nucléaires; s, spirilles.*

*Fig. 7. — Frottis de rate d'un embryon macéré. c, débris nucléaires; s, spirilles allongés; s', spirilles disposés en boucle.*

*Fig. 8. — Frottis de jaune d'œuf (point d'inoculation du virus). s, spirille allongé; s', spirille entourant un corpuscule vitellin; s'', spirilles entortillés.*

*Fig. 9. — Cellules granulées de l'aire vasculaire avec noyaux en karyokynèse.*

*Fig. 10. — Polynucléaire de l'aire vasculaire, ayant englobé des spirilles.*

*Fig. 11. — A gauche: polynucléaire du foie ayant phagocyté un spirille s. A droite: gros macrophage du foie. n, noyau; s, spirilles incurvés contenus dans des vacuoles digestives.*

*Fig. 12. — Macrophage de la rate ayant englobé un spirille, s.*

*Fig. 13. — Cellule mononucléaire avec des spirilles phagocytés, s (point d'inoculation du virus).*

**Pl. XXXIV.** — *Fig. 1. — Coupe de foie d'embryon macéré. v, vaisseau centrolobulaire contenant des hématies hémolysées, pourvues de noyaux hyperchromatiques. La paroi de ce vaisseau (*v'*) contient de nombreux spirilles; h, cellule hépatique altérée par le processus de macération; h', élément hépatique renfermant des spirilles; s, spirilles; n, noyaux d'hématies ayant perdu leur hémoglobine. (Imprégnation à l'argent; coloration au rouge neutre et au vert de méthyle.)*

*Fig. 2. — Coupe de foie atteint de nécrose. n, foyer de nécrose; h, cellule hépatique partiellement nécrosée et atteinte de dégénérescence graisseuse. Le protoplasma de cette cellule contient deux spirilles (s). g, globules de graisse (même coloration).*

*Fig. 3. — Coupe de rein provenant d'un embryon ayant succombé en pleine infection spirillienne. g, glomérule avec h, hématies; v, vaisseau glomérulaire, dont l'endothélium, e, renferme des spirilles partiellement dégénérés s, (même coloration).*

*Fig. 4. — Coupe d'un vaisseau rénal, v, h, hématies; m, macrophages ayant englobé des spirilles disposés en boucles (même coloration).*

*Fig. 5. — Coupe d'un tube contourné du rein (embryon partiellement macéré) e, épithélium rénal contenant des débris de spirilles. Les spirilles, s, s'infiltrent entre les cellules épithéliales et envahissent la lumière du canalicule s'.*

*Fig. 6. — Coupe de foie provenant d'un embryon sacrifié en pleine évolution de la spirillose. c, cellule hépatique; h, hématies; m, macrophages renfermant du pigment et des spirilles disposés en boucle (même coloration).*

*Fig. 7. — Coupe de foie atteint de nécrose. h, lobules hépatiques avec l, foyers hémorragiques; n, zone nécrosée (coloration au Van Gieson).*

# OBSERVATIONS SUR LA PHAGOCYTOSE IN VITRO

PAR LE DR M. LÖHLEIN, DE LEIPZIG

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

## DEUXIÈME MÉMOIRE

### Influence du sérum normal sur le processus phagocytaire (Fixateurs normaux.)

Après avoir constaté que les leucocytes normaux du cobaye ainsi que ceux de l'homme peuvent englober, sans le concours des humeurs, des microbes pathogènes, nous avons recherché si, comme l'ont prétendu *Wright* et *Douglas*, ces humeurs (ou plutôt le sérum sanguin) ont une influence importante sur le processus de la phagocytose.

Nous partons de faits bien constatés, qui ont trait à l'action de sérums spécifiques, en choisissant comme exemple celui du sérum de lapins vaccinés contre le streptocoque. Le mécanisme de l'immunité vis-à-vis de ce microbe, qui a été soigneusement étudié par *Denys* et *Leclef*<sup>1</sup>, *Bordet*<sup>2</sup>, a été élucidé récemment d'une manière définitive par *Neufeld* et *Rimpau*<sup>3</sup>. Ces auteurs ont montré qu'une substance contenue dans le sérum du lapin vacciné se fixe *in vitro* sur les streptocoques qui, alors, peuvent être englobés par les leucocytes du lapin; ceux-ci sont incapables de s'emparer du microbe tant qu'il n'a pas été sensibilisé.

Lorsque *Neufeld* et *Rimpau* faisaient agir le sérum spécifique sur les *leucocytes*, ceux-ci n'en devenaient pas plus actifs vis-à-vis des streptocoques.

Nous avons obtenu des résultats analogues en examinant l'action du sérum antistreptococcique provenant de chevaux immunisés<sup>4</sup>. Les résultats d'une expérience entreprise dans le

1. *Cellule*, 1895, p. 177.

2. *Ces Annales*, 1897, p. 177.

3. *Deutsche Med. Wochenschr.* 1904, p. 1458.

4. Nous remercions très sincèrement M. Besredka d'avoir bien voulu mettre à notre disposition, à maintes reprises, des échantillons de ce sérum.

but d'étudier ce mécanisme sont consignés dans un tableau que nous donnons plus tard (voir p. 944-945).

En partant de ce fait, nous pouvons préciser la question posée : Le sérum normal contient-il des substances qui, en se fixant sur le microbe pathogène, le rendent prêt à se laisser englober ?

De telles substances ont été décrites par *Wright et Douglas*<sup>1</sup>, qui leur ont donné le nom d' « opsonines ».

*Wright et Douglas* ont d'abord constaté que le sérum sanguin d'individus atteints de maladies staphylococciques exerce une influence favorisante sur la phagocytose *in vitro* du staphylocoque par les leucocytes du sang humain. De plus, en injectant des cultures chauffées du microbe, les auteurs constataient que, sous l'influence de ce traitement, le « opsonic power » du sérum d'un individu malade allait en croissant.

Partant de ces faits, ils constataient de plus, que le sérum *normal* humain exerçait une influence analogue sur la phagocytose du bacille de la peste, du micrococcus melitensis, du *bacterium coli*, du bacille de la dysenterie, du bacille charbonneux, bref, sur tous les microorganismes pathogènes qu'ils examinaient, sauf le bacille diphtérique et le bacillus xerosis.

*Hektoen et Ruediger*<sup>2</sup> ajoutaient la constatation de faits analogues pour le streptocoque et montraient que le sérum d'une espèce animale peut « sensibiliser » un microbe pour les phagocytes d'une autre espèce.

Ces derniers auteurs et un peu plus tard *Bulloch et Atkin*<sup>3</sup>, ont fait un examen approfondi de l' « opsonine ». Ils confirment les données de *Wright et Douglas* quant à la fixation de l' « opsonine » sur les microbes et constatent que cette fixation s'opère aussi à la température de 0°. Partant du fait communiqué par *W.* et *D.* qu'un chauffage à 60° pendant 10 minutes enlève au sérum sa propriété « opsonique », *H.* et *R.* étudient de plus près l'influence de la chaleur, et ils constatent qu'un chauffage à 54-56° pendant 30 minutes suffit pour rendre inefficace le sérum humain, celui du lapin et du cobaye, tandis que pour le sérum de chien la température critique est de 58-60°.

Un chauffage des microbes (streptocoques) ne les modifie pas

1. *Proceed. Royal Society*, 1904, t. LXXIII, p. 128.

2. *Journ. of Infect. Diseases*, 2, 1905, p. 128.

3. *Proceed. Roy. Society*, 74, 1905, p. 379.

au point de vue de l'effet « opsonique » et de la phagocytose.

Si l'on chauffe des microcoques « sensibilisés » à la température suffisante, pour rendre inefficace le sérum employé, ou à une température plus élevée de 3-4°, selon *H.* et *R.*, ils ne sont plus englobés ni par des leucocytes lavés ni par des leucocytes suspendus dans du sang désébriné. *Hektoen* et *Ruediger* en concluent que l'opsonine est modifiée, à cette température, d'une manière analogue à la transformation de compléments en complémentoïdes, et ils attribuent pour cette raison, à l'opsonine, une constitution semblable à celle du complément.

D'observations analogues ayant trait au staphylocoque, *Bullock* et *Atkin* tirent la conclusion que l'opsonine est détruite par un chauffage à 60°. Nous reviendrons sur ce point.

Enfin, *H.* et *R.* ont étudié l'influence de solutions de plusieurs sels et de la formaldéhyde sur l'englobement des microbes, et ils ont constaté le fait que la phagocytose s'opère d'une façon moins intense si l'on fait agir préalablement sur les microbes un mélange de quantités égales des solutions de mol/8 des sels (tels que  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) et de sang désébriné. En variant les conditions de leurs expériences, *Hektoen* et *Ruediger* montrent qu'il ne s'agit pas d'une influence quelconque « empêchante » sur les leucocytes, mais d'une sorte de neutralisation de la substance sensibilisante.

\* \*

Nous avons étudié les propriétés « opsoniques » du sérum normal du cobaye et nous avons obtenu, dans nombre d'expériences, des résultats analogues à ceux qui servent de base aux conclusions de *Wright* et des autres auteurs cités par nous. Il est nécessaire de donner quelques détails.

Dans les expériences suivantes, nous avons fait usage, en général, d'une méthode analogue à celle de *Wright* et de *Hektoen*: Une certaine quantité de liquide, dont on veut étudier l'influence sensibilisante, est ajoutée à une portion (en général égale) d'une émulsion de microbes, le mélange reste pendant 15 ou 30 minutes à la température de 38°, ainsi que des tubes témoins (contenant des mélanges d'émulsions et d'eau salée isotonique ou d'autres mélanges variant selon l'arrangement de l'expérience). Puis des leucocytes lavés du cobaye sont ajoutés et l'engagement est observé après des espaces de temps variables.

*Bacille charbonneux.*

*Wright et Douglas* publient le résultat très remarquable d'une expérience ayant trait au bacille charbonneux : ils comparent l'enveloppement de ce microbe par des leucocytes lavés du sang défibriné humain, suspendus d'une part dans du sérum frais humain, d'autre part dans du sérum chauffé à 60° pendant 10 minutes.

Dans le premier cas, ils observent une « phagocytose générale » ; dans le second, ils constatent « practically no signs of phagocytosis ». Nous avons obtenu des résultats analogues avec les leucocytes du cobaye (et ceux de l'homme) pendant les premiers stades du processus. Si l'on observe, après 15 ou 30 minutes, on voit que la différence va en diminuant et enfin disparaît parfois complètement. Voici un exemple :

## EXP. 50.

Des quantités égales d'une émulsion du bacille charbonneux M<sub>1</sub> et de sérums frais de différents animaux sont mélangés ; les tubes restent pendant une heure à l'étuve, puis pendant 40 minutes à la température de la chambre. Puis à chaque mélange nous avons ajouté quantité égale d'une suspension de leucocytes du cobaye lavés deux fois dans de l'eau physiologique.

Le tube VI sert de témoin contenant, au lieu de sérum, la même quantité d'eau physiologique.

*L'observation a lieu à la température de la chambre.*

SUSPENSIONS de bacilles additionnées de	LA PHAGOCYTOSE A LIEU APRÈS					
	3'	6'	15'	30'	1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>
I. Sérum de rat.....	+	++	+++	+++	+++	+++
II. Sérum de cobaye.....	+	++	+++	+++	+++	+++
III. Sérum de pigeon.....	+	+	+	++	++	+++
IV. Sérum de lapin.....	+	+	+	++	+++	+++
V. Sérum de souris.....	0	+	+	++	+++	+++
VI. Eau physiologique.....	0	0	+	+	++	+++

On voit nettement l'influence favorisante des différents sérum surtout de celui du rat et de celui du cobaye : 15 minutes après le commencement de l'expérience, l'englobement des bacilles charbonneux « sensibilisés » par les sérum des deux animaux a déjà atteint le point culminant, tandis que l'on n'observe que des traces de phagocytose dans le tube contenant des bacilles suspendus dans de l'eau physiologique. Donc si l'on ne compare que les trois ou quatre premières colonnes du tableau, on obtient le même résultat que celui communiqué par *Wright* et *Douglas*. Mais si l'on observe plus longtemps, la différence disparaît peu à peu, comme le montrent les colonnes suivantes.

Nous avons constaté un résultat analogue pour des leucocytes et du sérum humains.

Dans d'autres expériences semblables le résultat n'était pas toujours aussi net. Souvent l'englobement s'opérait tellement vite, même dans les tubes contenant les leucocytes lavés agissant en absence des humeurs, que l'on ne pouvait pas trouver de différence due à une action favorisante du sérum.

#### *Streptocoque.*

L'influence sensibilisante du sérum normal de cobaye sur certaines races de streptocoques est beaucoup plus évidente que celle que nous venons d'observer dans le cas du bacille charbonneux.

Nous nous bornons à donner l'exemple suivant d'une expérience qui démontre, en harmonie avec les observations des auteurs anglais et américains, le fait que le mécanisme de l'action du sérum normal ressemble tout à fait à celui du sérum spécifique.

#### Exp. 70.

14.4. 1905. — L'expérience concerne deux races de streptocoques dont Str. Od, IV. n'est que peu virulent pour la souris (voir p. 944), Str. Az est beaucoup plus virulent. — Les différents sérum examinés agissent d'abord pendant 30 minutes à la température du sang soit sur les microbes (1<sup>re</sup> partie), soit sur les cellules animales (2<sup>e</sup> partie de l'expérience). Puis les éléments cellulaires sont séparés des liquides à l'aide de la force centrifuge et lavés une fois dans de l'eau physiologique, centrifugés de nouveau et suspendus dans de l'eau physiologique. Puis on ajoute

à la suspension de streptocoques des leucocytes lavés 3 fois auparavant, et à celle des leucocytes une suspension de streptocoques.

### I. — STREPTOCOQUE ODESSA IV

#### A. Action des sérums sur le microbe.

	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après.		
	10 minutes.	45 minutes.	2 heures.
Sur 5 c. c. de culture en bouillon au sérum agissent préalablement 5 c. c. de			
1. Eau physiolog.....	++	++	+++
2. S. antistreptococc .....	++	+++	+++
3. S. norm. du cheval préalablement chauffé à 60°.....	++	+++	+++
4. S. normal frais de cobaye.....	+++	++	+++

#### B. Action des mêmes liquides sur les leucocytes.

	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après.		
	10 minutes.	45 minutes.	2 heures.
Sur 5 c. c. de suspension de leucocytes lavés agissent préalablement 5 c. c. de			
9. S. antistreptococc.....	++	++	+++
10. S. norin. inactif de cheval.....	+	+	++
11. S. norm. frais de cobaye.....	+	++	++

## II. — STREPTOCOQUE Az.

Même dispositif expérimental.

## A. Action des sérum sur le microbe.

Sur 5 c. c. de culture en bouillon à 1 sérum agissent préalablement 5 c. c. de	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après.		
	10 minutes.	45 minutes.	2 heures.
5. Eau physiologique.....	+	++	++
6. Sérum antistreptococc.....	+	+++	+++
7. S. normal de cheval chauffé...	++	+++	+++
8. S. normal frais de cobaye.....	++	+++	+++

## B. Action des mêmes liquides sur les leucocytes.

Sur 5 c. c. de suspension de leucocytes lavés agissent préalablement 5 c. c. de	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après.		
	10 minutes.	45 minutes.	2 heures.
12. Sérum antistreptococcique...	+	+	++
13. Sérum de cheval chauffé....	0	+	+
14. Sérum normal fr. de cob.....	0	+	++

Ce qui résulte d'une façon évidente, surtout de la 2<sup>e</sup> partie de l'expérience qui a trait au streptocoque Az, c'est qu'en effet le sérum normal ainsi que le sérum spécifique agit sur les microbes et que cette influence, aussi dans le cas du sérum normal apparemment, consiste dans la fixation d'une substance « sensibilisante » sur le microbe.

Cette action du sérum faisait complètement défaut lorsque nous avons examiné le streptocoque (virulent) F qui échappait à l'englobement de la part des leucocytes lavés. A plusieurs

reprises nous avons traité ce streptocoque par du sérum normal frais de cobaye avant de le mettre en présence des leucocytes; nous n'avons jamais constaté de différence entre l'intensité de l'englobement dans les tubes contenant le sérum actif et dans les tubes témoins, la phagocytose faisant complètement défaut. En même temps que le streptocoque F., nous avons observé chaque fois, et dans les mêmes conditions, une autre race plus accessible à la phagocytose, l'englobement de cette race témoin nous fournissant la preuve que les leucocytes étaient en bon état et capables de saisir des microbes accessibles.

Donc nous n'avons pu constater l'influence sensibilisante du sérum de cobaye que quand nous avions affaire à des variétés de streptocoques qui, même sans ce traitement préalable, étaient jusqu'à un certain point accessibles à la phagocytose.

#### *Bacterium coli.*

Si on laisse agir sur le *Bact. coli* le sérum actif du cobaye, on observe un effet bactériolytique plus ou moins accusé. Nous nous occuperons plus tard de la question des rapports entre cette action du sérum et son influence excitatrice de la phagocytose. Ici nous nous bornons à communiquer les résultats que nous avons obtenus, en comparant l'englobement de trois races différentes du *Bact. coli*, sous l'influence du sérum et en l'absence de celle-ci.

#### EXP. 71.

##### L'expérience porte sur le bacille Coli I.

Sur 4 c. c. de culture en bouillon du bacille agissent préalablement, à la température du sang pendant 40', 4 c. c. de	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après		
	10 minutes.	30 minutes.	1 h. 45
Eau physiologique.....	+	++	+++
Sérum normal frais de cobaye....	+++	+++	+++
Sérum de cobaye chauffé à 55°.	+	++	+++

Il ressort de cette expérience que le *Bact. coli*, qui est englobé par les leucocytes lavés, l'est beaucoup plus vite quand on a soin de le soumettre à un traitement préalable par le sérum normal de cobaye; cette influence du sérum fait complètement défaut quand on a chauffé préalablement le sérum à 55° pendant 30 minutes.

Avant d'interpréter cette observation nous donnons les résultats obtenus pour les *Bact. coli C et J* (voir p. 947 et 948).

Il est intéressant d'observer l'influence du sérum normal justement dans le cas du *Bact. coli C* qui, si aucun traitement préalable n'a eu lieu, n'est guère englobé par les leucocytes lavés. Dans l'expérience suivante nous avons comparé la phagocytose du bacille C — « sensibilisé » et non « sensibilisé » — et celle du bacille J sous les mêmes conditions. (Le dernier est très accessible à l'englobement par les leucocytes du cobaye.)

#### EXP. 84.

Des quantités égales de cultures en bouillon des deux bacilles et des liquides à examiner sont mélangées et restent à l'étuve pendant 30 minutes. Puis des leucocytes lavés sont ajoutés.

#### *Coli C.*

TRAITEMENT PRÉALABLE	ENGLOBEMENT OBSERVÉ APRÈS		
	10 minutes.	40 minutes.	1 h. 20
1. Sérum actif de chien.....	0	+(?)	+
6. Sérum actif de cobaye.....	0	+	+
7. Eau physiologique.....	0	+	+

Coll. J.

TRAITEMENT PRÉALABLE	ENGLOBEMENT OBSERVÉ APRÈS		
	10 minutes.	40 minutes.	1 h. 20
1. Sérum actif de chien.....	++	+++	+++
6. Sérum actif de cobaye .....	+++	+++	+++
7. Eau physiologique.....	++	+++	+++

En résumé : Le bacille C n'est guère englobé même après avoir subi l'influence du sérum normal. Le bacille J devient rapidement la proie des phagocytes, même sans aucun concours du sérum, dont il est impossible de mettre en évidence l'influence « sensibilisante ».

Nous ajoutons enfin un exemple ayant trait au *Bact. coli* R qui en même temps montre que l'effet sensibilisant du sérum se produit aussi à la température de 0°.

### EXP. 87.

Des quantités égales d'une culture en bouillon de *Bact. coli* R et de sérum normal frais de cobaye sont mises en contact : 1° à 37°, 2° à la température de la chambre, 3° à 0°. Après un quart d'heure, on sépare les microbes du liquide à l'aide de la force centrifuge, puis on lave le sédiment dans l'eau physiologique (plus quelques gouttes de bouillon) et après les avoir centrifugés encore une fois, on met les bacilles en suspension dans de l'eau physiologique. Le tube n° 4 contient des *Bact. coli* provenant de la même culture et suspendus dans du sérum de cobaye chauffé pendant 15 minutes à 56°; le tube n° 5 contient des bacilles coli, plus une quantité égale d'eau salée isotonique. 4 et 5 servent de témoins. Les 5 tubes restent pendant un quart d'heure à l'étuve, puis des leucocytes lavés de cobaye sont ajoutés.

	INTENSITÉ DE LA PHAGOCYTOSE observée après		
	10 minutes.	20 minutes.	45 minutes.
1. Sérum frais de c. a agi sur les bacilles à 37°.....	+++	+++	+++
2. Le sérum a agi à la température de la chambre.....	+++	+++	+++
3. Le sérum a agi à 0°.....	+++	+++	+++
4. Sérum de cobaye chauffé à 56°, a agi sur les bacilles .....	(+?)	+	+
5. Eau salée isotonique a agi sur les bacilles.....	(+?)	+	+

Les préparations obtenues des n°s 1, 2, 3, après 10 minutes montrent déjà une transformation granuleuse intracellulaire extrêmement marquée, cependant que celles des tubes 4 et 5, servant de témoins, même après 45 minutes, n'en montrent que des traces.

#### *Vibrio cholérique.*

Si on laisse agir à 37° sur des vibrions cholériques (variété Bombay) une quantité suffisante de sérum normal frais de cobaye, nous constatons une transformation granuleuse complète de ces vibrions au bout de 30 minutes à une heure. Ces granulations mises en contact avec des leucocytes lavés du cobaye sont englobés beaucoup plus vite que des vibrions frais qui servent de témoins. Il est évident que dans ce cas il s'agit d'un effet bactériolytique du sérum.

Si d'un autre côté on fait agir le sérum frais sur les vibrions à la température de 0°, on ne remarque pas de différence nette entre l'intensité de l'englobement de ces microbes « sensibilisés » et de vibrions non préparés.

Il se peut que d'autres races du microbe se prêtant mieux à ces expériences fournissent des résultats différents.

\* \*

Nous n'interprétons pas encore ces observations. Il suffit d'indiquer ici, qu'elles confirment en général — pour les microbes choisis par nous et pour le leucocyte et le sérum de cobayes — les données de *Wright* et des autres auteurs cités. Nous avons constaté une influence sensibilisante du sérum normal sur une partie de ces microbes, influence qui peut s'opérer à la température de 0° et qui fait défaut dans le cas où ce sérum a été chauffé à 55° pendant 30 minutes. Cette action consiste dans la fixation, sur les microbes, de substances contenues dans le sérum.

Il est nécessaire d'attirer l'attention sur le point suivant :

L'intensité de cette influence sensibilisante du sérum normal varie beaucoup suivant les différents microbes pathogènes examinés et suivant les *races* d'un même microorganisme : Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un effet opsonique du sérum de cobaye sur le vibrio cholérique qui, sans aucune action sensibilisante, devient la proie des leucocytes. D'un autre côté, l'action de ce sérum sur le bacille charbonneux et surtout sur quelques races de *Bact. coli* et de streptocoques a pu être constatée facilement, cependant que d'autres races de ces derniers microbes échappaient aux leucocytes, même après avoir subi l'influence du sérum.

Pour pouvoir comparer plus facilement ces résultats avec ceux communiqués dans notre premier mémoire, nous donnons le tableau suivant qui, pour chaque microorganisme examiné, répond à ces questions : 1<sup>o</sup> Intensité de l'englobement *in-vitro* sans le concours des humeurs. 2<sup>o</sup> Intensité de l'englobement sous l'influence du sérum. Dans une troisième colonne enfin nous donnons, pour ainsi dire, la différence des deux premières colonnes, c'est-à-dire l'influence « sensibilisante » du sérum normal qui peut être mise en évidence.

MICROORGANISME	INTENSITÉ de l'englobement par les leucocytes lavés.	INTENSITÉ de l'englobement sous l'influence du sérum normal.	INFLUENCE « sensibilisante » du sérum.
Vibrio cholérique ....	+++	+++	0 (bactériolyse !)
Bacille charbonneux....	+++ (apr. 2 heures.)	+++ (apr. qq. min.)	(Influence accélérante du sérum.)
Streptocoque Odessa IV.	++	+++	+
Streptocoque Az. Bacille coli R.....	+	+++	++
Bacille coli C.....	+	+	0
Streptocoque F.....	0	0	0

Résumons : Parmi les races d'un même microbe pathogène, il y en a qui, même sous l'influence du sérum normal, échappent complètement aux leucocytes du cobaye *in vitro*; il y en a d'autres qui, même sans le concours des humeurs, deviennent rapidement la proie des cellules. Ce n'est qu'un nombre restreint de races microbiennes qui se prêtent bien à l'examen des propriétés « opsoniques » du sérum normal.

\* \* \*

En entreprenant l'examen plus approfondi des propriétés opsoniques du sérum normal, nous nous occuperons d'abord d'une objection qu'on pourrait faire aux conclusions tirées par nous des expériences mentionnées jusqu'ici :

Le fait que l'influence « opsonique » disparaît du sérum justement à la température qui détruit la cytase, suggère l'idée que peut-être il s'agit ici d'une action combinée d'ambocepteurs et de complément. On pourrait penser que la cytase, à l'aide d'ambocepteurs, se fixe sur les microbes et les rend accessibles à l'englobement. En d'autres termes, il est nécessaire de considérer

comme possible la fixation d'une « bactériolysine » (Ehrlich), sur les microbes. Celle-ci pourrait bien avoir lieu sans que la bactériolyse s'opérât immédiatement ou après un temps restreint. Il suffit de supposer une réaction bactéricide relativement lente et qui, sans se manifester par une diminution du nombre des microbes (streptocoques, bacilles charbonneux), suffirait cependant pour rendre ces derniers susceptibles d'être englobés.

*Bullock* et *Atkin* se sont déjà occupés de cette supposition d'une action combinée de deux substances produisant l'effet opsonique. Ils ont été amenés à la repousser d'après leurs expériences sur le staphylocoque.

Dans des recherches entreprises dans le même but, nous nous sommes servi d'une race de *Bact. coli* sensible, et à l'action bactériolytique et à l'action « opsonique » du sérum normal.

Dans l'expérience suivante nous partons de l'idée que, si la destruction de la *cytase* seule fait disparaître d'un sérum chauffé à 55° l'action « opsonique », on devrait réussir à rendre à un tel sérum son efficacité en y ajoutant une quantité déterminée de sérum frais contenant de la *cytase*.

Voici les résultats d'une expérience disposée dans ce but :

#### Exp. 73.

A 8 tubes à essai, contenant chacun 0,5 c. c. de la même culture en bouillon (de 5 heures) du *Bact. coli* I on ajoute : 1<sup>o</sup> des mélanges de quantités déterminées de sérum normal frais et d'eau salée isotonique (tubes 1-4); 2<sup>o</sup> des mélanges de sérum chauffé pendant 30 minutes à 55° (tubes 5-8). Les tubes restent à l'étuve pendant 15 minutes, puis on y ajoute des leucocytes lavés.

Les tubes 9-12 servent de témoins.

N°	Culture.	QUANTITÉ DE		ENGLOBEMENT OBSERVÉ après	
		Sérum frais.	Eau salée.	5 minutes.	15 minutes.
1	0,5	0,4	0,9	+	?
2	0,5	0,2	0,8	++	
3	0,5	0,5	0,5	+++	
4	0,5	0,5	0	+++	

## I.

N°	Culture.	QUANTITÉ DE		ENGLOBEMENT observé après.	
		Sérum frais.	Sérum chauffé.	5 minutes.	15 minutes.
5	0,5	0,4	0,9	(+)	
6	0,5	0,2	0,8	++	
7	0,5	0,5	0,5	+++	
8	0,5	0,5	0	+++	

## II. (TÉMOINS)

N°	Culture.	Liquide ajouté.	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après.	
			5 minutes.	15 minutes.
9	0,5	—	0	+
10	0,5	Sérum chauffé 0,5.	0	+
11	0,5	Eau salée 0,5.	0	+

Nous avons répété cette expérience en variant seulement la quantité de culture ; les résultats obtenus ont été tout à fait analogues à ceux résumés dans le tableau ci-dessus. Donc l'action « opsonique » dépend, dans le cas examiné, seulement de la quantité de sérum non chauffé.

De plus, pour mettre en évidence que la *cytase* n'a rien à faire avec l'action « sensibilisante » du sérum, nous avons à notre disposition les expériences déjà mentionnées et qui montrent la fixation de l'opsonine sur les microbes à la température de 0°. On peut facilement montrer que des *Bact. coli*, « sensibilisés à cette basse température, puis lavés deux fois et suspendus dans de l'eau physiologique (+ quelques gouttes de bouillon) ne subissent pas de bactéryolyse à la température du sang, cependant qu'une action bactéricide nette et rapide se montre quand on ajoute quelques gouttes de sérum « actif » normal, contenant du complément.

Cette dernière observation prouve que l'« ambocepteur » bactériolytique s'est fixé, ainsi que l'« opsonine », sur les *Bact. coli* à la température de 0° ; mais que la *cytase*, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, n'a pas été fixée en même temps sur les microbes.

\* \* \*

En cherchant à préciser la nature des « opsonines », les auteurs américains et anglais ont tâché d'élucider leur *constitution*, ils ont obtenu des résultats différents.

*Hektoen* et *Ruediger* ont laissé agir sur des streptocoques un sérum normal ; puis ils ont chauffé à 58°, pendant un quart d'heure, les microbes ainsi préparés. Ils constatent que les micro-organismes traités ainsi ne sont plus englobés par des leucocytes, même si on les « sensibilise » de nouveau, en ajoutant du sérum normal frais. Ils interprètent cette observation en supposant l'existence de deux groupements dans l'opsonine, dont l'un (le groupement haptophore), capable de se fixer sur les microbes, résiste au chauffage, cependant que l'autre (le groupement « opsoniphore ») est détruit à la température de 55 à 58°. Le groupement haptophore dans ce cas empêcherait la fixation d'autres molécules d'opsonine. (Phénomène analogue à la transformation des compléments, des

précipitines, des agglutinines en complémentoïdes, précipitinoïdes, agglutinoïdes.)

Bulloch et Atkin ont fait des expériences analogues avec le staphylocoque. Ils constatent qu'on peut chauffer ce microbe, préalablement sensibilisé par le sérum normal, à une température de 60° pendant des heures, sans qu'il cesse de pouvoir être englobé. Par conséquent, ces auteurs attribuent à l'« opsonine » une « constitution simple ».

En disposant des expériences analogues avec le streptocoque et le *Bact. coli*, nous avons relevé l'existence d'une source d'erreurs très importante dans le dispositif des expériences précédentes. La voici : Les microbes traités avec le sérum, puis chauffés à 58°, ne se colorent que d'une manière très faible et peu distincte. Le *Bact. coli* surtout ne prend plus guère le bleu d'azur dans ces conditions. Il devient donc très difficile de juger ainsi, à l'aide de préparations colorées, de l'intensité de la phagocytose.

Voici pourquoi nous n'attachons pas de valeur démonstrative à certains résultats que nous avons obtenus avec une espèce de streptocoques (Az) et qui paraissent favorables à l'opinion de Hektoen et Ruediger. Nous nous bornons à mentionner ici brièvement un exemple de ces expériences.

#### EXP. 98.

On laisse agir sur une suspension de streptocoques (culture en bouillon de 14 h. de la variété Az), à la température de 0° pendant 15°, une quantité égale de sérum normal frais de cobaye.

Puis les microbes sont ensuite centrifugés, lavés avec de l'eau salée isotonique, centrifugés de nouveau et suspendus dans de l'eau physiologique.

Une moitié de cette suspension (2) est chauffée à 58° pendant 15 minutes. Le tube n° 3 contient une suspension du même streptocoque dans de l'eau salée. Des leucocytes lavés sont introduits au même moment dans ces trois tubes.

	INTENSITÉ DE L'ENGLOBEMENT observé après.			
	4 minutes.	12 minutes.	20 minutes.	2 heures.
1. Str. traité au sérum normal.....	++	++	+++	+++
2. Str. traité au sérum normal, puis chauffé à 55°.....	+	+	+	++
3. Str. suspendu dans de l'eau physiologique .....	(+?)	+	++	+++

Il ressort de cette expérience que l'action sensibilisante « du sérum normal », qui se montre ici d'une façon nette (voir les colonnes 1 et 3), disparaît après le chauffage à 58° des microbes sensibilisés. Nous avons disposé une expérience analogue en employant les leucocytes de souris, le même streptocoque Az et le sérum normal de cobaye, comme sensibilisateur. Dans ce dernier cas nous avons trouvé que, même après avoir ajouté aux microbes sensibilisés et chauffés à 50° une quantité de sérum frais, l'englobement de ces microbes s'opère d'une manière beaucoup moins intense que celui des microorganismes traités simplement avec le sérum normal ; il n'est pas plus intense que celui des microbes non sensibilisés.

Des expériences analogues faites avec le *Bact. coli* ne seront pas mentionnées pour la raison énoncée plus haut. La colorabilité de ce microbe est diminuée d'une façon telle qu'il devient impossible de juger de l'intensité de la phagocytose.

Dans d'autres cas, les différences entre le degré de l'englobement des microbes sensibilisés et non sensibilisés étaient insignifiantes. Si on observe l'influence sensibilisante du sérum normal sur la phagocytose d'un microbe, qui même sans cette préparation devient facilement la proie des leucocytes, il est évident que ce microbe ne se comportera pas autrement vis-à-vis des polynucléaires qu'un corps étranger, tel qu'un grain de carmin par exemple. Par conséquent on ne trouvera pas de différences nettes entre l'intensité de l'englobement d'un pareil microbe sensibilisé ou non sensibilisé. En tous cas,

on ne doit pas s'attendre à observer, dans ces conditions, l'absence absolue du phénomène de la phagocytose. Peut-être Bulloch et Atkin ont eu affaire dans leurs expériences citées à une pareille espèce de staphylocoques.

Ce qui nous intéresse surtout ici, ce sont les conclusions qu'on peut tirer de ces observations sur la constitution des « opsonines ». Il est évident que nous inclinons vers l'opinion de Hektoen et Ruediger plutôt que vers celle de Bulloch et Atkin, c'est-à-dire nous trouvons probable la supposition des premiers auteurs, que l'opsonine consiste en deux groupements dont l'un, groupement haptophore, est thermostable et capable de se fixer sur les microbes, tandis que l'autre, groupement opsoniphore est thermolabile.

\* \* \*

Peut-on d'après tout ce que nous venons d'exposer et en harmonie avec la plupart des données de Wright, Hektoen, Bulloch, conclure que les « opsonines » sont vraiment des principes particuliers du sérum normal? Ou bien sont-elles identiques à un des anticorps normaux déjà connus? Nous avons montré plus haut que la cytase n'a rien affaire avec l'action opsonique du sérum. On pourrait penser à une identité entre les « opsonines » et les « sensibilisatrices » bactériolytiques.

Plusieurs faits plaident en faveur de cette idée : d'abord la fixation des « opsonines » ainsi que des ambocepteurs sur les microbes à la température 0°; de plus la constitution apparemment semblable des deux substances, selon Ehrlich, les ambocepteurs possèdent deux groupements ; or, il semble en être de même des « opsonines ». Mais l'opinion générale admet que la sensibilisatrice est thermostable, cependant que « l'opsonine » est détruite à la température de 55°.

Pourtant nous savons, depuis les recherches d'Ehrlich, Jacks et d'autres auteurs, qu'il y a des ambocepteurs thermolabiles et des compléments thermostables ; par conséquent la destruction, à la température de 50°, d'une substance de sérum normal ne prouve pas d'une façon rigoureuse que cette substance ne soit pas un ambocepteur.

Essayant d'élucider la question de l'identité des opsonines et des sensibilisatrices bactériolytiques, nous avons choisi le *Bact. coli* pour la raison déjà mentionnée plus haut, à savoir que ce

microbe subit l'influence lytique du sérum aussi bien que son action « opsonique ».

Etant donné le fait que cette dernière propriété disparaît après un chauffage du sérum à 55°, nous pouvions préciser la question de la manière suivante : La sensibilisatrice bactériolytique du sérum normal de cobayes (pour le *Bact. coli*) est-elle détruite à la température de 55° ? Nous avons disposé quelques expériences dans le but de trancher cette question : Sur des quantités égales de *Bact. coli*. (variété J ; culture en bouillon), nous avons fait agir à la température de 0° : 1° une quantité donnée de sérum normal frais de cobaye, 2° une quantité égale du même sérum chauffé à 55° pendant 30 minutes. Puis nous avons séparé, toujours à la même température basse, les bacilles des liquides à l'aide de la force centrifuge et nous les avons lavés deux ou trois fois avec de l'eau salée isotonique additionnée d'un peu de bouillon. Les microbes ont été ensuite suspendus dans des quantités égales du même liquide ; nous avons ajouté à chacun de ces deux tubes la même petite quantité de sérum normal frais de cobaye contenant du complément.

Trois expériences arrangées de cette façon nous ont fourni des résultats analogues : *Le nombre des bacilles, constaté à l'aide de plaques de gélose, a été plus petit dans le cas où le sérum actif avait agi préalablement sur les microbes ; la diminution du nombre des bacilles a été moins grande dans le cas où le sérum « sensibilisant » avait été inactivé à 55°.* Cependant, dans ce dernier cas, la destruction des bacilles n'était pas due seulement à la petite quantité de sérum « actif » ajoutée : l'effet bactériolytique d'une quantité égale de sérum frais a été précisé chaque fois pour éviter cette erreur. — Nous sommes donc amenés à conclure de ces observations *que la sensibilisatrice bactériolytique, en tout cas, n'est pas complètement détruite à la température de 55° (ni même à celle de 58°, d'après l'une de nos expériences)*<sup>1</sup>, cependant que la propriété opsonique disparaît complètement du sérum de cobaye à cette température.

Ces résultats plaident en faveur de l'opinion suivant laquelle

1. Il paraît pourtant, d'après ces expériences, que l'action sensibilisante du sérum est diminuée par le chauffage à 55°. HAHN (*Deutsch. Arch. f. Klin. Med.* 82) a observé un phénomène analogue en examinant l'effet bactériolytique du sérum humain normal vis-à-vis du bacille typhique.

les « opsonines » ne sont pas identiques aux « ambocepteurs » normaux.

Tout ceci prouve donc que la substance « opsönique » n'est pas identique ni à la bactériolysine, ni au complément, ni aux ambocepteurs du sérum frais.

On pourrait penser à l'identité des « opsonines » et des agglutinines. Sans entrer dans un examen plus approfondi de cette question, nous nous bornons à indiquer le fait que nous avons observé, dans un grand nombre d'expériences, une très nette agglutination des microbes par le sérum normal qui en même temps les avait préparés à la phagocytose.

Tant que nous ne posséderons pas de notions plus précises concernant les agglutinines du sérum normal et surtout la nature du processus agglutinatif, nous ne pourrons pas réfuter cette opinion. Les faits connus jusqu'à l'heure présente ne sont pas incompatibles avec l'opinion que les « opsonines » pourraient être identiques aux agglutinines. Les deux substances se fixent sur les microbes à une température relativement basse; leur constitution apparemment est semblable.

Quoiqu'il nous soit impossible, — d'après tout ce que nous venons d'exposer, — de nous prononcer sur la nature de la « propriété opsonique » du sérum normal, nous pouvons préciser son origine. Les recherches soigneuses de *Hektoen* et *Ruediger* citées plus haut sur l'influence de certaines solutions de sels sur le processus phagocytaire, rendent très probable l'opinion que, dans tous les cas, la phagocytose des microbes pathogènes s'opère à l'aide d'une action « opsonique » qui précède l'englobement même. S'il en est ainsi, les faits exposés par nous — surtout dans notre premier mémoire, — amènent à la conclusion ferme que le leucocyte, en l'absence d'« opsonines » libres, est à même de fabriquer lui-même ces substances. Les opsonines sont donc d'après nous d'origine phagocytaire.

\* \* \*

Dans ce mémoire, nous avons suivi la terminologie usuelle qui, en général, admet l'identité de la « sensibilisatrice » (Bordet, Metchnikoff), du « fixateur » Metchnikoff et de l'« ambocepteur » (bactériolytique) d'Ehrlich, le « immunkörper » de Pfeiffer, et

nous avons fait usage des expressions « opsonines, propriété opsonique » dans le sens de *Wright* qui les a introduites dans la terminologie. Mais ce n'est que dans le but de faciliter la description de nos observations et d'éviter tout malentendu que nous avons employé ces derniers noms nouveaux.

L'introduction de ces termes n'est pas justifiée puisque les substances du sérum normal, décrites d'abord par *Wright*, jouent un rôle analogue à celui des substances spécifiques connues sous le nom de fixateurs (*Metchnikoff*) : *Die Lehre von den Phagocyten... Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann*). Cependant, il faut admettre que ces « fixateurs », dans le sens de la théorie phagocytaire, ne sont pas identiques — du moins ne sont pas tous identiques, — aux embocepteurs d'*Ehrlich*. Donc, si l'on emploie le nom de « fixateur » ou de « sensibilisatrice », il faudra ajouter l'adjectif « bactériolytique » s'il s'agit d'une substance qui, en se fixant sur un microbe donné, le rend accessible à l'action digestive du complément *in vitro*, l'adjectif « phagocytaire », s'il s'agit d'une substance qui, en se fixant sur un microbe, le rend prêt à se laisser phagocytter.

Il est évident que, *sensu stricto*, ce ne sont que ces dernières substances qui, selon *Metchnikoff*, méritent le nom de « sensibilisatrices » ou de « fixateurs ». En tout cas, nous n'avons pas besoin d'une nouvelle expression pour désigner les « fixateurs » (phagocytaires) du sérum normal. Le mérite de *Wright* d'avoir mis le premier en évidence la présence de ces substances dans le sérum *normal*, n'en est pas diminué.

#### CONCLUSIONS

1. La phagocytose *in vitro* de microbes pathogènes par les leucocytes du cobaye ne dépend que, dans un nombre restreint de cas, de la présence de substances favorisantes (« opsonines » de *Wright*), à l'état libre. Si vraiment le processus phagocytaire ne s'opère qu'à l'aide de ces substances, il faut admettre qu'elles peuvent être fournies par les leucocytes mêmes.

2. Le sérum normal de cobayes contient des substances qui, en se fixant sur certains microbes pathogènes, les préparent, dans certains cas surtout, pour la phagocytose (*Wright*).

3. Ces substances se fixent sur les microbes, même à la température de 0°; elles sont détruites à la température de 55°. Il paraît qu'elles possèdent une constitution analogue à celle des agglutinines (deux groupements). Elles ne sont identiques ni aux bactériolysines, ni aux sensibilisatrices bactériolytiques, ni au complément. Il n'est pas encore possible de dire qu'elles ne sont pas identiques aux agglutinines du sérum normal.

(Ces résultats confirment en général les données de *Hektoen et Ruediger*.)

4. L'introduction du nouveau nom d'« opsonines » pour ces substances n'est pas justifiée; car elles jouent exactement le rôle attribué par *Metchnikoff* aux « fixateurs ». Pour éviter toute erreur nous proposons de distinguer les substances sensibilisantes des sérums normaux et spécifiques en ajoutant à l'expression usuelle de « sensibilisatrice » (fixateur, *Zwischen-Körper*, *Immunkörper*), les adjectifs « phagocytaire » ou « bactériolytique ».

Qu'il nous soit permis à la fin de ce travail de remercier très sincèrement M. Metchnikoff d'avoir bien voulu nous assister de ses précieux conseils.

---

# DOSAGE DE LA MATIÈRE ALBUMINOÏDE

NON TRANSFORMÉE DANS LES FROMAGES

PAR MM. TRILLAT ET SAUTON.

---

Le dosage de la matière albuminoïde du fromage, non encore transformée par la caséase et les microbes, peut présenter un grand intérêt.

D'abord, au point de vue de la comparaison de la valeur alimentaire des divers fromages, il est utile de connaître la proportion de caséine non encore digérée.

Ce dosage peut permettre aussi de suivre la marche de la décomposition de la caséine dans diverses circonstances et, par suite, il peut fournir des documents précis permettant au praticien de suivre la fabrication du fromage.

Enfin, il permet d'établir ce que Duclaux appelait le *rapport de maturation* du fromage, rapport dont la connaissance, d'après ce savant, est indispensable pour l'étude générale de la dégradation de la caséine solubilisée par la caséase et attaquée par les microbes.

Les chimistes qui ont cherché à doser la caséine, dans le fromage en voie de maturation, se sont heurtés à de multiples inconvénients chaque fois qu'ils ont voulu établir une méthode analytique précise. Duclaux, qui s'en est occupé et qui avait créé une méthode destinée seulement à le renseigner sur le gros du phénomène de la maturation, en avait reconnu lui-même la nécessité.

\* \* \*

Avant d'exposer le nouveau procédé que nous proposons, nous allons résumer les méthodes actuellement suivies et les défauts qu'elles présentent.

Le premier procédé consiste à doser la caséine par différence, comme pour le lait. Les erreurs dans ce dosage sont les mêmes que celles que nous avons signalées dans notre note sur le dosage de la caséine dans le lait<sup>1</sup>. Cette méthode a fait du reste l'objet de nombreuses critiques; elle est ici particulièrement défectueuse parce qu'elle conduit à évaluer en bloc, sous le nom de caséine, les substances les plus diverses.

Un deuxième procédé consiste à évaluer le poids de la caséine en cherchant à l'isoler, par des lavages à l'eau, de toutes les autres parties constituantes du fromage. Dans ce cas, la méthode pêche par défaut, car une partie de la caséine est solubilisée au cours du traitement par suite de la présence des sels ammoniacaux. Il est connu en effet que la caséine est partiellement soluble dans une eau si légèrement alcaline soit-elle. Il en résulte en outre que dans le dosage ultérieur des matières azotées du filtrat, on compte comme caséine transformée ce qui n'est que de la caséine dissoute.

Un troisième procédé consiste à doser, d'une part, l'azote total, et, d'autre part, celui des produits solubles provenant de la dégradation de la matière albuminoïde, et de l'évaluer en caséine en multipliant le chiffre d'azote par le coefficient 6,25. Cette méthode est longue puisqu'elle comporte deux dosages d'azote, et, de plus, incertaine, comme le fait remarquer Duclaux, puisqu'on s'appuie sur un coefficient conventionnel<sup>2</sup>.

Ce savant, qui s'est préoccupé de séparer la caséine intacte de ses produits de transformation, évaluait par différence la caséine totale et isolait la caséine soluble par filtration à travers la bougie de porcelaine. Il fait remarquer lui-même l'imperfection d'un semblable procédé qu'il utilisait, faute d'une meilleure méthode, et qui n'était destiné qu'à le renseigner sur la marche générale de la maturation du fromage.

Le nouveau procédé du dosage que nous proposons repose sur l'insolubilisation, sous l'action de la formaldéhyde, de la matière albuminoïde non transformée du fromage. C'est l'application du même principe que celui que nous avons déjà utilisé pour le lait<sup>3</sup>.

1. *Bull. de la Soc. chim.*, octobre 1906.

2. DUCLAUX, *Le Lait*, p. 156.

3. *Comptes Rendus Ac. Sc.*, 26 mars 1906.

## MÉTHODE OPÉRATOIRE

On introduit 2 grammes de fromage dans un becherglass d'environ 100 c. c., contenant 10 c. c. d'eau chaude; on désagrège rapidement en agitant avec une baguette de verre et en ajoutant peu à peu 50 c. c. d'eau (pour les fromages durs, on broie le fromage dans une petit mortier en employant de l'eau très légèrement ammoniacalisée). On porte à l'ébullition pendant 5 minutes; le liquide est ensuite additionné de 0,5 c. c. de formol commercial. On maintient à l'ébullition pendant 3 minutes et l'on abandonne ensuite le liquide au repos pendant 5 minutes; la matière grasse se rassemble à la surface. On précipite alors la caséine par 5 gouttes d'acide acétique pur, en ayant soin d'agiter constamment pour diviser le précipité; quand la couche surnageante est limpide, on recueille sur un petit filtre taré le précipité blanc et pulvérulent qui est dégraissé par l'acétone<sup>1</sup> dans un appareil à épuisement et enfin séché à 75-80° et pesé. La matière grasse peut être évaluée à part en recueillant et évaporant l'acétone dans un vase taré.

Cette méthode, appliquée à divers fromages du commerce, nous a donné les résultats suivants (les chiffres se rapportent à des fromages bruts, humidité non déduite) :

## DOSAGE DE LA MATIÈRE ALBUMINOÏDE DANS DIVERS FROMAGES

Désignation commerciale du fromage.	Matière albuminoïde non transformée 0/0	Désignation commerciale du fromage.	Matière albuminoïde non transformée 0/0
Camembert.....	48,200	Roquefort (demi-mûr) ..	44,650
Gruyère.....	31,340	Roquefort (très mûr) ..	7,100
Gervais .....	6,415	Hollande .....	31,50
Brie .....	22,930	Munster .....	27,47

L'application du procédé permet facilement de suivre la marche de la maturation et d'établir, à n'importe quel moment, le rapport qui existe entre la caséine primitive et la caséine digérée. En voici un exemple provenant des analyses effectuées

1. Nous avons reconnu que l'acétone était un meilleur dissolvant du beurre que l'éther; c'est pour cette raison que nous l'avons déjà utilisé pour extraire la matière grasse du lait. L'acétone a la propriété de précipiter la totalité de la matière albuminoïde du lait, dans certaines conditions, et nous avions songé à l'utiliser pour le dosage. Une note parue depuis aux *Comptes rendus* (C. R. 1906, p. 1345) préconise ce système, auquel nous avons renoncé en raison des difficultés pratiques qu'il présente et qui, sans une nouvelle étude, le rendent inappréciable.

sur des prélevements de fromage de Roquefort, à diverses époques de son affinage.

APPLICATION DE LA MÉTHODE A DES FROMAGES DE ROQUEFORT  
EN COURS DE MATURATION

DATE des prélevements.	I CASÉINE		II CASÉINE	
	non digérée 1/0	digérée 1/0	non digérée 0/0	digérée 0/0
Fromage frais au début...	19,480	0	19,550	0
Après 8 jours.....	18,120	1,360		
— 15 — .....	11,650	7,330	45,600	3,950
— 30 — .....	8,000	41,480	40,720	8,830
— 60 — .....	7,403	42,380	40,000	9,550

## CONTROLE DE LA MÉTHODE

Un procédé analytique a d'autant plus de valeur qu'il a été plus soigneusement contrôlé; aussi notre attention s'est-elle spécialement portée sur ce point. Nous nous sommes posé diverses objections; elles nous ont conduits à effectuer les essais suivants, qui constituent la plus longue partie de notre travail.

A. — Nous avons analysé la matière albuminoïde séparée et nous avons constaté qu'elle ne laissait, comme résidu, que des traces négligeables de cendres et qu'elle ne contenait ni lactose, ni matière grasse, ni excès de formaldéhyde.

B. — Nous avons ensuite déterminé sa composition élémentaire qu'il est intéressant de rapprocher de celle trouvée par Hammarsten.

TABLEAU INDiquANT LA COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DE LA CASÉINE  
FORMULÉE COMPARATIVEMENT AVEC LA CASÉINE D'HAMMARSTEN

Matière albuminoïde insolubilisée, du fromage.	du lait.	Composition de la caséine d'après Hammarsten.
Carbone .....	53,450	52,880
Hydrogène.....	7,080	6,960
Azote.....	15,530	15,800
Oxygène.....	22,607	22,820
Phosphore .....	0,838	0,710
Soufre.....	0,795	0,830
Cendre.....	impondérable.	impondérable.
	100,000	100,000
		100,000

On voit aussi dans ce tableau que la composition élémentaire de la caséine retirée du lait est sensiblement la même que celle du fromage.

C. — La théorie s'accorde avec la pratique pour démontrer que la matière albuminoïde du fromage, à la suite de son insolubilisation sous l'action de la formaldéhyde, ne varie pas apparemment de poids et que cette variation est inférieure aux erreurs de pesées. Nous en avons déjà fait la démonstration pour la caséine du lait.

a) La comparaison des poids moléculaires de la matière albuminoïde et de l'aldéhyde formique indique suffisamment que le poids du résidu aldéhydique fixé est insignifiant, par rapport à celui de la molécule albuminoïde combinée, et ne peut entraîner qu'une augmentation de poids négligeable.

b) L'insolubilisation de la caséine, exposée sous une cloche contenant des traces de trioxyméthylène, se produit avec une variation à peine apparente de poids. Pour s'en rendre compte, nous avons placé sous une cloche une quantité rigoureusement pesée de caséine. Quand, au bout de 15 jours, le poids était devenu constant, nous avons introduit du trioxyméthylène sous la cloche. Sous l'influence de ses vapeurs, l'insolubilisation de la caséine s'est produite, après 24 heures, sans modification sensible dans son poids primitif.

On peut donc conclure de l'ensemble de ces résultats que, sous l'influence de l'aldéhyde formique, la matière albuminoïde ne change ni de poids, ni de composition élémentaire.

D. — Pour démontrer que le formol n'insolubilise pas les produits de dégradation de la caséine, nous avons fait des digestions artificielles de caséine du lait, en présence de pepsine, de papaïne, de pancréatine, et nous avons constaté qu'au cours de ces digestions, la quantité de matière albuminoïde insolubilisée par le formol allait sans cesse en diminuant.

Voici, à titre d'exemple, des expériences qui le démontrent : 50 c. c. de lait ont été additionnés de 6 c. c. d'acide chlorhydrique à 10° 0' 0 et de 0<sup>gr</sup>.10 de pepsine, puis abandonnés à l'étuve à 37°.

Deux autres essais ont été effectués, l'un avec 0<sup>gr</sup>.20 de pancréatine, l'autre avec 0<sup>gr</sup>.20 de papaïne, en remplaçant l'acide chlorhydrique par de l'eau distillée et en opérant à 50°.

La caséine de ces laits a été dosée par la méthode au formol avant la digestion par les diastases, et après 12 heures nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU INDiquANT LES VARIATIONS DE POIDS QUE SUBIT LA CASÉINE  
AU COURS DES DIGESTIONS DIASTASIQUES

	Caséine 0/0.		Caséine 0/0
Lait témoin.....	37,250	Lait témoin.....	37,330
Même lait { 3 heures.    3,650 :    Papaïne, 12 heures.....    0,310			
avec pepsine. { 12 —    0,920    Pancréatine, 12 heures...    0,420			

Des résultats analogues ont été obtenus en faisant varier les conditions d'expériences. C'est ainsi que les produits de digestion n'ont jamais pu être insolubilisés : les peptones commerciales, délayées dans un peu d'eau et traitées par un excès de formol à froid ou à chaud, conservent leur solubilité dans les solvants de la caséine.

En se plaçant dans les conditions de notre méthode, nous avons aussi soumis à notre procédé d'analyse des liquides de digestions pepsique et pancréatique, provenant de produits commerciaux utilisés dans les laboratoires. Dans ces expériences, l'action du formol, unie à celle de la chaleur et de l'acide acétique, n'a fourni aucun précipité insoluble.

D'autres essais nous ont en outre démontré que, si on précipite par l'acide trichloroacétique les matières albuminoïdes de digestion et qu'on fasse agir sur elles, à chaud, l'aldéhyde formique en excès, conditions extrêmement favorables à l'insolubilisation, le précipité obtenu est soluble dans les alcalis ou dans un excès du précipitant. Les produits de dégradation de la matière albuminoïde ne sont donc pas insolubilisés par la formaldéhyde.

\* \*

Tous ces essais de contrôle démontrent donc :

- 1<sup>o</sup> Que la caséine est entièrement séparée;
- 2<sup>o</sup> Qu'elle ne renferme pas de matières étrangères;
- 3<sup>o</sup> Qu'elle possède bien la composition élémentaire de la caséine du lait;
- 4<sup>o</sup> Que la caséine, ainsi séparée, ne subit pas de variation apparente de poids par suite de son insolubilisation par l'aldéhyde formique;
- 5<sup>o</sup> Que le traitement par le formol n'insolubilise pas les peptones et les albumoses;
- 6<sup>o</sup> Que la méthode est applicable aux diverses digestions

auxquelles peut être soumise la caséine et qu'elle peut être utilisée par conséquent pour tous les fromages.

En résumé, nous pensons que la simplicité de notre procédé permettra de l'utiliser couramment, soit dans le laboratoire pour l'analyse des fromages, soit dans la fabrication pour l'étude de la maturation.

---

# NOTE SUR UNE MALADIE SPHACELLAIRE DES BOVIDÉS DU PARAGUAY

PAR LES DR<sup>S</sup> ELMASSIAN ET R. URIZAR

---

En 1905, alors que l'un de nous dirigeait encore l'Institut National de *Bactériologie* du Paraguay, nous avons étudié une affection grave des bovidés de ce pays. Elle se traduisait par des troubles généraux et par des lésions cutanées, consistant en de multiples plaques de sphacèle. De l'œdème du train postérieur et une cachexie profonde en caractérisent la période finale qui aboutit presque toujours à la mort.

On pourrait croire qu'il s'agit ici d'une de ces multiples manifestations cliniques dues au bacille de la nécrose. Mais, en outre que les *processus* gangréneux n'ont pas, dans le cas qui nous occupe, les localisations habituelles chez les veaux et les bœufs, le bacille filamenteux décrit par Loeffler, Schmorle et d'autres auteurs fait totalement défaut. Au contraire un gros bâtonnet observé par nous dans les tissus malades nous permet d'affirmer que l'affection dont nous allons parler, tout en appartenant cliniquement au groupe des affections gangréneuses, en diffère cependant par son étiologie. Nous lui donnons le nom de maladie de Barnès, en reconnaissance du gracieux concours que nous avons reçu de M. Barnès pendant une épidémie déclarée dans sa propriété de Patiño-Cué.

Nos recherches sont loin d'être terminées, néanmoins elles sont suffisantes pour qu'il soit possible de dégager dès à présent les lignes principales de l'histoire clinique et épidémiologique de cette affection.

*Description clinique et lésions externes.* — Le début de l'affection est toujours signalé par l'apparition inopinée d'une plaque de sphacèle sur la région périnéale, d'une dimension de 10-15 c. Cette localisation de la première lésion est presque une règle; neuf fois sur dix elle se fait là où nous venons d'indiquer. Elle peut cependant se montrer par exemple sur les oreilles, à la base de la queue, sur les mamelles (chez les yaches), etc.

Dans ces cas le *processus sphacellaire* provoque la chute des organes qu'on vient d'énumérer et l'on voit alors, dans un troupeau contaminé, plus d'une bête se promener avec un moignon de queue ou une oreille en moins<sup>1</sup>.

Il est difficile de saisir la série d'altérations microscopiques qui précède la formation de la plaque initiale; car celle-ci survient d'habitude chez des animaux sains en apparence, et elle évolue d'une façon rapide. Mais dans la majorité des cas, en plus de la lésion principale il y a de nombreuses plaques secondaires de moindre dimension qui apparaissent par poussées et qui occupent le cou et les flancs de l'animal. Et l'on a ainsi tout le loisir d'assister à leur évolution. Sur le point où une plaque de sphacèle va se produire, les poils deviennent rares et semblables à du duvet.

La peau, un peu irritée, prend l'aspect rougeâtre et devient sensiblement oedématiée. Un matin on trouve que toute cette partie modifiée est isolée des parties saines par une incision qui semble faite artificiellement par un bistouri.

Pendant les premiers jours qui suivent, il en coule une sanie abondante qui se sèche au niveau de l'incision et la dessine d'une façon visible même de loin. Jamais ces plaques ne se sphacèlent complètement, sauf celles qui sont de petites dimensions. La plupart restent adhérentes aux tissus sous-jacents. Quand elles s'en détachent spontanément elles laissent voir une surface sanguinolente, qui se cicatrise facilement. Quelquefois le processus gangréneux s'étend aux parties profondes, en partant des bords de la portion de peau isolée; mais jamais il n'arrive à la détacher complètement, si elle est de certaine étendue. Toute la périphérie de cet îlot cutané peut se sécher, se relever, mais en restant toujours adhérent. Même en tirant avec une pince, on n'arriverait pas à produire une séparation.

La région malade est parfois soulevée par un œdème très prononcé et dur, prenant ainsi l'apparence d'une tumeur. Cela est encore plus manifeste chez des sujets porteurs de vieilles lésions qui sont compliquées par le développement d'une énorme quantité de larves. Celles-ci ont creusé de vastes

1. Nos clichés présentant quelques-uns de ces animaux ont été détruits par accident au cours d'un voyage.

galeries, entourées d'une zone inflammatoire due aux injections secondaires. Ces altérations, parfois considérables, simulent une production néoplasique.

Les indigènes, trompés par la présence de ces larves, ont cru de tout temps qu'il s'agissait, dans l'espèce, d'un accident traumatique initial, produit par un coup de corne et compliqué plus tard par les mouches. De là le nom de « Cornada » créé par les garçons de boucheries et d'abattoirs. Il est curieux cependant que les mêmes accidents arrivent aux mêmes régions, c'est-à-dire aux environs de l'anus, puisque c'est là qu'apparaît la première plaque gangrénouse.

Parmi les symptômes extérieurs l'œdème a une grande importance, bien qu'il puisse faire défaut dans beaucoup de cas. Il est important par ce fait qu'il présente des caractères typiques et une localisation invariable. D'abord fruste et insignifiant autour et en dessous des parties sphacellées, il devient bientôt envahissant et gagne tout le train postérieur. Il est dur, résistant sous le doigt et présente même parfois une consistance presque ligneuse. Dans ce cas il rend difficile la marche, provoque l'écartement des membres postérieurs et donne à l'animal une attitude des plus typiques. Il n'est pas rare que des malades dans cet état tombent sur-le-champ et périssent plutôt par la faim et la soif que par l'évolution normale de l'affection.

Après la mort, on est frappé de la résistance qu'offre au couteau ces tissus œdématiés. La surface de section est d'une couleur saumon et marbrée par d'innombrables stries rouges, d'un ton très vif qui, à notre sens, caractérisent cet œdème spécial. Point important : pendant la section il suinte peu de liquide. Au microscope le tissu cellulaire sous-cutané présente une notable augmentation en nombre et en volume des faisceaux de fibrilles conjonctives, sans qu'il y ait parallèlement une multiplication des autres éléments normaux du même tissu. Dans les interstices des faisceaux, d'ailleurs peu écartés, on trouve quelques cellules migratrices et parfois quelques saprophytes.

La température, au-dessus de la normale au début, tombe au-dessous dans la période cachectique. Et d'ailleurs n'ayant pu reproduire expérimentalement l'affection qui nous occupe, la courbe de son mouvement fébrile nous échappe totalement.

Quant à l'amaigrissement, presque nul dans la période

initiale, il devient profond à l'approche du dénouement fatal. Lorsque le poids cesse de diminuer, c'est un bon signe chez les animaux traités.

*Lésions internes et altérations du sang.* — Aucun organe thoracique n'est le siège de lésions. Parmi ceux de l'abdomen, il n'y a que le péritoine et les reins qui paraissent altérés. Les deux feuillets du premier sont par endroits épaissis, injectés et adhérents, tout cela coexistant avec une petite quantité d'épanchement séro-sanguinolent, ne présentant rien de particulier au microscope. Les points les plus atteints du péritoine sont ceux qui correspondent à la face convexe du foie, la face postérieure de l'estomac et une grande partie des deux faces de la rate, etc. En résumé, il y a là toute une série de lésions qui signalent l'existence *in-vitam* d'une périctonite subaiguë, à marche très lente.

Les reins sont souvent turgescents et de volume augmenté. Leurs capsules se séparent facilement ; toutefois, au-dessous d'elles, il n'est pas rare de constater un piqueté rouge noirâtre qui révèle leur état hyperhémique. Sectionnés dans le sens de leur diamètre somatique, ils présentent dans leur couche périphérique, sur les points les plus rapprochés de leurs bords convexes et aussi au niveau des pyramides, une teinte plus vive qu'ailleurs ; ceci corrobore l'examen de l'extérieur de ces organes. Au microscope, ce sont les lésions des congestions et les hémorragies qui prédominent, avec une légère altération des glomérules de Malpighi. Là où on avait constaté préalablement une coloration intense, on trouve les capillaires dilatés et remplis de globules rouges. Certains de ceux-ci sont extravasés et remplissent des espaces en forme de toutes petites fusées.

Plusieurs glomérules sont envahis par les cellules migratrices qui se dressent autour d'eux. Les endothéliums des capillaires sont un peu boursouflés, fixent trop les colorants ; leurs noyaux sont gros et se teignent d'une façon intense : une légère capillarite péri-tubaire et péri-glomérulaire.

Le sang s'est montré toujours modifié. Une notable réduction des hématies et une hypoleucocytose polynucléaire caractérise cette modification. Par contre, les éosinophiles et les gros mononucléaires sans granulations spécifiques avec gros noyaux ovalaires ou incurvés, sont très nombreux. Notons aussi la

présence d'une espèce de corpuscules ronds dont la nature et la signification nous échappe. Ils sont de différentes dimensions; la plupart plus petits que les hématies, ont un contour aussi régulier que ces dernières. Très visibles dans la goutte pendante, ils s'y distinguent des autres éléments du sang en ce qu'ils sont plus pâles et plus aplatis.

Sur la préparation colorée, par la méthode de Laveran et Mesnil, celle de Giemsa ou simplement par l'action successive de l'hématine et l'éosine, on voit que ces corpuscules présentent deux parties bien distinctes : une centrale, fixant les couleurs nucléaires, et une périphérique se teignant par les couleurs acides (voir fig. 1). Ainsi, si l'on s'est servi du bleu-éosine, le centre du corpuscule apparaît d'un bleu intense et la périphérie rose, plus pâle que les globules rouges à côté.

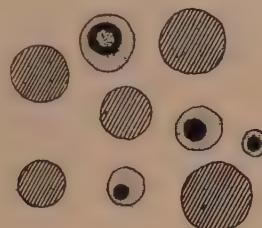


Fig. 1.

Ceux qui sont d'une dimension très réduite ( $2-3 \mu$ ) présentent tout à fait au centre un petit point fixant intensément le bleu, comme un grain de chromatine condensé; tandis que chez les trop gros, non seulement ce petit point manque, mais encore il y a à sa place un espace incolore granulé et jaunâtre.

Plus nombreux dans le sang des cachectiques que dans celui des individus récemment contaminés, ces corpuscules n'y font jamais défaut durant tout le cours de l'infection.

Quelle est la nature exacte de ces corpuscules?

Peut-on leur reconnaître une origine parasitaire?

Il nous est, pour le moment, difficile de le dire. Tout ce que nous pouvons ajouter, c'est que nous avons observé des corpuscules analogues chez des singes et des chevaux extrêmement anémiques à la suite d'inoculation grave de trypanosomes cadériques et aussi chez un petit aigle qui a présenté longtemps des contractures tétaniques. Il nous semble que ces éléments sont

des hématies altérées, ou pour mieux dire des hématies atteintes par des substances toxico-infectantes au moment de leur formation.

*Bactériologie.* — Le sang et la pulpe des organes ensemencés sur les divers milieux n'ont rien donné d'important. Du sang inoculé à de jeunes vaches n'a produit qu'un mouvement fébrile, insignifiant, et les fameux corpuscules dans la circulation sanguine plusieurs jours après l'épreuve.

Rien à l'endroit inoculé.

Dans les coupes microscopiques du tissu cellulaire prélevé aux environs du processus sphacellaire, nous avons observé la présence d'un gros bacille, de 5-7  $\mu$ , ne prenant pas le Gram, que nous n'avons pu isoler par les procédés culturaux ordinaires.

\* \* \*

*Quelques considérations épidémiologiques.* — L'épidémie dont nous nous occupons s'est montrée au Paraguay, simultanément au mois de janvier 1905, dans les régions de Patiño-Cué et de Taenaral, régions distantes l'une de l'autre d'une vingtaine de kilomètres et reliées entre elles par une voie ferrée. Chez M. C. Barnes, à Patiño, il y eut 10 malades (sur 40), 7 (sur 20) chez une de ses voisines et enfin 3 (sur 35) chez un autre éleveur, ce qui fait en somme une contamination de 20 0/0 sur le total de l'effectif.

La maladie n'apparut jamais, dans une même ferme, simultanément sur plusieurs individus, mais toujours successivement, chez un, puis chez un autre. Ce fait est important, et nous porte à croire que les animaux ont pu se contagionner entre eux avant qu'on ait pu prendre quelques mesures prophylactiques. Comme cause générale on a incriminé les plantes vénéneuses, mais cette thèse est peu admissible, étant donné que les résultats d'un empoisonnement devaient se faire sentir sur plusieurs animaux à la fois. D'autre part, ces accidents d'intoxication devraient se produire encore assez fréquemment sur les champs défrichés et incultes de ces régions. Or, il n'en est rien. Depuis de longues années que M. Barnes est établi à Patiño, c'est la première fois qu'il observe l'affection dont il s'agit. Cet éleveur incrimine les mouches piquantes. Il croit que les manifestations cutanées, les premières parmi toutes, sont dues à la piqûre des *Oestrus bovis* (Bot-fly en anglais).

Cela n'est pas surprenant, car les *Oestrus* abondent dans la région et les parties de la peau les premières lésées sont les plus délicates et les plus minces, comme par exemple la zone péri-anale, les oreilles, etc. Nous ne croyons pas cependant que la piqûre seule de ces insectes soit la cause efficiente du mal. Il nous paraît plus vraisemblable d'admettre qu'ils jouent ici un rôle de vecteurs pour un parasite qui reste à être déterminé.

Au point de vue du traitement et de la prophylaxie, il convient de séparer et d'isoler les malades dans un enclos, loin des animaux sains. A Patiño, on a badigeonné les placards gangrénous avec de l'huile phéniquée à 4 0/0; les points suintants des bords des plaques initiales ont surtout été l'objet de soins minutieux; on y appliquait l'huile antiseptique après avoir nettoyé et enlevé les croutes.

Une ration supplémentaire est parfois nécessaire pour les animaux qui sont très émaciés, ou qui éprouvent des difficultés à marcher à cause de l'œdème de leur train postérieur. Les animaux malades, abandonnés à leur sort, ont toujours péri et nous ne connaissons pas un seul cas de guérison.





Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4

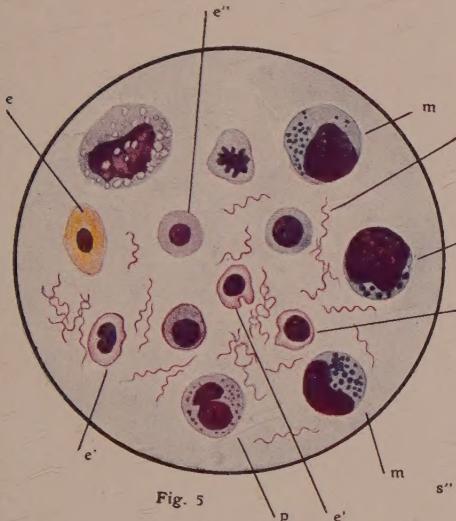


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

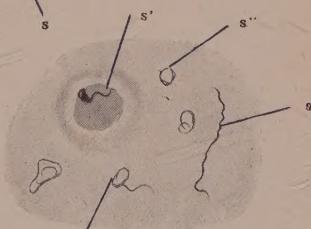


Fig. 8

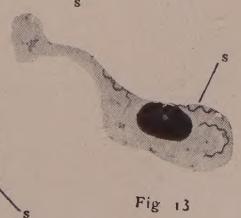


Fig. 13

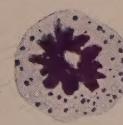


Fig. 9

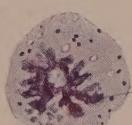


Fig. 10



Fig. 11



Fig. 12

